

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 24일 (24.09.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/189911 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/352 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/002773

(22) 국제출원일: 2020년 2월 26일 (26.02.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0029921 2019년 3월 15일 (15.03.2019) KR

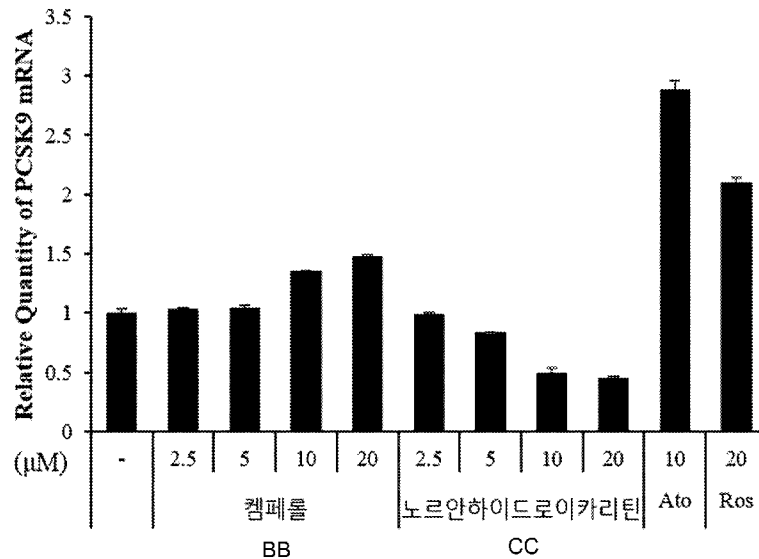
(71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 종로구 대학로 101, Seoul (KR). 한국생명공학연구원

(KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김효수 (KIM, Hyosoo); 04419 서울시 용산구 독서당로 111, 105동 T-102호, Seoul (KR). 장현덕 (JANG, Hyunduk); 03322 서울시 은평구 갈현로29길 11, 101동 208호, Seoul (KR). 안경섭 (AHN, Kyung Seop); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 오세량 (OH, Sei-Ryang); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 박지원 (PARK, Ji Won); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권옥경 (KWON, Ok-Kyoung); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 류형원 (RYU, Hyung Won); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(54) Title: COMPOSITION INCLUDING NORANHYDROICARITIN, FOR PREVENTING OR TREATING CARDIOVASCULAR METABOLIC DISEASES

(54) 발명의 명칭: 노르안하이드로이카리틴을 포함하는 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물



BB ... Kaempferol
CC ... Noranhydroicaritin

(57) Abstract: The present invention relates to a composition which is for preventing or treating cardiovascular metabolic diseases and includes noranhydroicaritin or a pharmaceutically acceptable salt thereof. The composition is not toxic to cells and is thus safe, and suppresses the production of PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) and promotes the production of LDLR (Low density lipoprotein receptor), and thus has high utility as a composition for preventing or treating cardiovascular metabolic diseases. In addition, noranhydroicaritin according to the present invention can be used in a food composition for preventing or ameliorating cardiovascular metabolic diseases, a health functional food composition for preventing or ameliorating cardiovascular metabolic diseases, and a method for preventing or treating cardiovascular metabolic diseases, the method comprising a step for administering a composition which

(74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울시 송파구 법원로 135 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.

(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))

includes noranhydroicaritin as an active ingredient.

(57) 요약서: 본 발명은 노르안하이드로이카리틴(noranhydroicaritin) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 세포에 대한 독성이 없어 안전성을 확보하면서도, PCSK9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)의 생성을 억제하고, LDLR(Low density lipoprotein receptor)의 생성을 촉진하여 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서 활용도가 높다. 또한, 본 발명의 노르안하이드로이카리틴은 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 노르안하이드로이카리틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료방법으로 사용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 노르안하이드로이카리틴을 포함하는 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 노르안하이드로이카리틴(noranhidroicaritin)을 포함하는 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로, 세포에 대한 독성이 없으면서, PCSK9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 생성을 억제하고, LDLR(Low density lipoprotein receptor)의 생성을 촉진하는 효과를 갖는 노르안하이드로이카리틴을 포함하는 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 노르안하이드로이카리틴을 포함하는 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 노르안하이드로이카리틴을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 최근 풍부하고 다양한 식생활 및 생활양식의 변화로 영양섭취는 불균형 상태가 되기 쉬우며 기계화된 현대 생활은 운동 부족을 초래하게 되었다. 그 결과 질병의 형태도 선진국형으로 변화하고 그에 따라 심혈관 대사 질환의 이환율도 증가하고 있다. 심혈관 대사 질환이란, 생체내의 당질, 지질 등의 대사 불균형에 의해 발생하는 질환을 말하는 것으로, 심혈관 질환, 이상지질혈증, 비만 또는 당뇨병 등이 주요 질환에 해당한다.
- [4] 심혈관 질환은 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환으로, 전세계적으로 가장 높은 사망의 원인이 되는 질환이다. 심혈관 질환에 속하는 주요 질병으로는 고혈압, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 죽상경화증, 뇌졸중, 부정맥 등이 있다. 심혈관 질환과 관련된 위험인자는 연령, 성별, 흡연, 운동부족 및 비만 등이 있으나, 최근 서구화된 식생활 및 급격한 생활양식의 변화를 고려할 때, 특히 지단백(lipoprotein)에 의한 콜레스테롤의 축적이 대표적인 원인으로 꼽힐 수 있다.
- [5] 동맥경화증은 동맥 내벽에 지방질 및 섬유조직이 쌓여 혈관벽이 좁아지거나 막히게 되는 것으로, 동맥경화증이 가벼울 경우 정상적인 활동에 지장은 없으나, 동맥경화증으로 관상조직의 50~70% 이상이 막히면 동맥경화성 심장병이 야기될 수 있다. 또한, 심할 경우 뇌동맥 또는 관상동맥이 파열될 수 있고 이 경우 뇌혈관 질환, 심장질환 등의 심혈관계로 발전하게 된다. 뇌동맥경화증의 경우 뇌연화증의 원인이 되며, 관상동맥경화증의 경우 협심증, 심근경색 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 또한, 이로 인해 고혈압, 심장병, 뇌일혈 등이 유발될

수 있다. 현재 동맥경화증의 치료제로 HMG-CoA reductase 저해제인 다양한 스타틴(statin) 계열 약물 등이 개발되어 있으나, 여전히 보다 효과적인 치료제의 개발의 필요성이 대두되고 있다.

- [6] 이상지질혈증은 혈중에 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 또는 중성지방이 증가된 상태거나, HDL-콜레스테롤이 감소된 상태를 의미한다. 구체적인 예로, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증 등이 여기에 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 유전적 요인, 비만, 당뇨 또는 음주 등의 원인에 의해 발생할 수 있으나, 특히 지방 함량이 높은 식생활에 의해 혈중 지질이 증가되어 이상지질혈증이 발생할 수 있다. 최근 한약재 및 식품 등의 천연물 유래 활성성분을 이용한 대체요법 또는 다양한 추출물의 제조방법으로, 고지혈증 치료용 사물활혈탕 조성물(한국공개특허 제2015-0064400호)등이 개발되고 있으나, 기존의 합성 약학적 조성물보다 치료 효과가 우수하며, 부작용이 적은 천연 약학적 조성물 또는 그 원료에 대한 개발은 아직까지 미비한 실정이다.
- [7] 비만은 지방간, 고혈압, 당뇨병, 심혈관계질환 등의 만성질환을 유발하는 것으로 널리 알려져 있으며, 최근 보건복지가족부의 2007년 국민건강·영양조사결과에 의하면 한국성인의 31.7%가 비만으로 나타났다. 또한, 전 세계인구의 약 25%에 해당하는 17억명이 현재 과체중(BMI> 25)이고, 미국, 유럽, 일본 등 주요 국가들의 1억 2천명을 포함한 서구지역 3억명 이상이 비만환자(BMI> 30)로 분류되고 있다. 국내외에서 판매되는 비만치료제로는 미 FDA에서 승인을 받은 orlistat을 주원료로 하는 '제니칼'이 있는데, 리파아제 작용을 억제하는 제니칼의 경우 지방변, 가스생성, 지용성 비타민 흡수 저하 등의 위장계 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.
- [8] 당뇨병은 인슐린 분비가 부족한 경우(I형), 또는 인슐린에 대한 감수성이 떨어져 당질 대사에 이상이 생기는 경우(II형)의 두 가지 유형이 있고, 전체 당뇨병 환자 중 90%를 차지할 정도로 II형이 훨씬 더 흔하다. II형 당뇨병은 인슐린 비-의존성 당뇨병(non-insulin-dependent diabetes mellitus/NIDDM)으로, 종래 인슐린 비-의존성 당뇨병을 치료하기 위한 물질로서는 PPAR- γ 활성제, GLP-1 유도체, DPP-IV 저해제, PTP1B 저해제 등이 개발되어 있으나, 각각의 부작용으로서 간이나 신장, 근육, 심장에 대한 독성 및 체중증가 증상 등이 알려져 있다.
- [9] 요컨대, 심혈관 대사 질환의 주요 원인을 해결하기 위해, 혈중 지질 농도를 저하시키는 것이 중요하다고 할 수 있고, 혈중 지질 농도를 저하시키는 방법으로는 고지방 식이를 억제하는 식이요법, 운동요법 및 약물요법 등이 권장되고 있다. 그러나, 식이요법이나 운동요법은 엄격한 관리 및 실시가 어려우며, 그 효과에 한계가 있는 경우가 많다. 또한 현재까지 개발된 지질 농도 감소제로는 담즙산 결합 수지, HMG-CoA 환원효소 억제제, 네오마이신 등과 같은 콜레스테롤 함량을 저하시키는 약제 및 피브리산 유도체, 니코틴산 및 어유 등 중성지방 함량을 낮추는 약제들이 치료제로 이용되고 있다. 그러나 이와 같은

약제들은 간 독성, 위장장애 및 암 발생 등과 같은 부작용이 있다.

- [10] 한편, 본 발명에 사용한 노르안하이드로이카리틴(noranhidroicaritin)은 화학식 C₂₀H₁₈O₆을 가지는 분자량 354.3629인 화합물(Komatsu et al. 1970)로서, 고삼(苦蔘, [Sophora flavescens] Aiton)에 함유된 플라보노이드(Flavonoid) 계열 화합물로 알려져 있다. 현재까지 노르안하이드로이카리틴이 특정 질병의 억제 활성이 있다고 알려진 바는 없고, 다만 노르안하이드로이카리틴의 모체가 되는 캄페롤(Kaempferol)은 알레르기성 천식의 억제, 항암, 항염, 항산화 등에 효과가 있다고 알려져 있을 뿐이다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 천연물로부터 유래되어 안전성을 나타내면서도 심혈관 대사 질환에 대한 예방 또는 치료효과가 우수한 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 고삼으로부터 수득한 플라보노이드 계열 화합물인 노르안하이드로이카리틴이 세포독성이 없으면서도 PCSK9 생성을 억제하고 LDLR 생성을 촉진하여 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 본 발명의 하나의 목적은 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 다른 목적은 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[18]

발명의 효과

- [19] 본 발명의 고삼으로부터 추출한 성분인 노르안하이드로이카리틴은 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 효과가 우수하다. 구체적으로, 본 발명의 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 세포에 대한 독성이 없어 안전성을 확보하면서도, PCSK9의 생성을 억제하고, LDLR의

생성을 촉진하여 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서 활용도가 높다. 또한, 본 발명의 노르안하이드로이카리틴은 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 개선용 식품 조성물, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 노르안하이드로이카리틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료방법으로 사용할 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 노르안하이드로이카리틴과 캄페롤을 각각 농도별로 처리한 HepG2 세포의 세포생존율을 나타낸 것이다.

[22] 도 2는 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리한 HEK293T 세포의 세포생존율을 나타낸 것이다.

[23] 도 3은 노르안하이드로이카리틴과 캄페롤을 각각 농도별로 처리한 HepG2 세포에서 PCSK9 mRNA의 양을 나타낸 것이다.

[24] 도 4는 노르안하이드로이카리틴과 캄페롤을 각각 농도별로 처리한 HepG2 세포에서 LDLR mRNA의 양을 나타낸 것이다.

[25] 도 5는 PCSK9 promoter-reporter construct를 transfection시킨 HEK293T 세포에서 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리하고, HEK293T 세포의 PCSK9 luciferase 활성을 나타낸 것이다.

[26] 도 6은 PCSK9 및 LDLR을 표적으로 하는 면역블롯(immunoblotting)을 수행하여 그 발현 정도를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[27] 도 7은 HepG2 세포에서 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리시 PPAR α 와 PPAR γ 의 mRNA량을 나타낸 것과, PPAR α 와 PPAR γ 의 증가량을 면역형광염색법으로 나타낸 것이다.

[28] 도 8은 SREBP 프로모터-리포터 구조(promoter-reporter construct)를 형질주입(transfection)시킨 HEK293T세포에서 노르안하이드로이카리틴과 캄페롤을 각각 농도별로 처리하여 SREBP luciferase 활성을 나타낸 것이다.

[29] 도 9는 HepG2 세포에 노르안하이드로이카리틴과 스타틴을 병용처리하였을 때 동맥경화에 관여하는 단백질의 발현변화를 나타낸 것이다.

[30] 도 10은 PCSK9으로 자극한 HepG2 세포에 노르안하이드로이카리틴과 스타틴을 병용처리하였을 때 동맥경화에 관여하는 단백질(LDLR)의 발현변화를 나타낸 것이다.

[31] 도 11은 HepG2 세포에 노르안하이드로이카리틴과 프라바스타틴(Pravastatin), 피타바스타틴(Pitavastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 또는 심바스타틴(Simvastatin)을 병용처리하였을 때 동맥경화에 관여하는 단백질인 PCSK9의 발현 변화를 나타낸 것이다.

[32] 도 12는 HepG 세포에 노르안하이드로이카리틴과 아토바스타틴(Atorvastatin),

로수바스타틴 (Rosuvastatin), 프라바스타틴(Pravastatin), 피타바스타틴(Pitavastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 또는 심바스타틴(Simvastatin)을 병용처리하였을 때 동맥경화에 관여하는 단백질인 LDLR의 발현 변화를 나타낸 것이다.

[33] 도 13은 PCSK9 과 노르안하이드로이카리틴을 처리한 마우스 동맥경화 모델을 나타낸 것이다.

[34] 도 14는 마우스 동맥경화 모델 확인을 위해, 웨스턴 블롯을 통해 간 조직에서의 PCSK9 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[35] 도 15는 마우스 동맥경화 모델에서 carotid-ligation 후, 노르안하이드로이카리틴에 의한 회복 정도를 나타낸 것이다.

[36] 도 16는 마우스 동맥경화 모델에서 노르안하이드로이카리틴 처리시, 염증반응을 일으키는 대식세포의 마커 F/480, 염증반응이 일어날 때 분비되는 전염증성 싸이토카인인 TNF- α , IL-1 β , MCP-1, 및 PCSK9의 수준을 면역형광법을 통해 확인한 것이다.

[37]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[38] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[39]

[40] 본 발명은 상기와 같은 과제들을 해결하고, 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[41] 본 발명의 다른 하나의 양태로, 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[42] 본 발명의 "노르안하이드로이카리틴(noranhidroicaritin)"은 화학식 $C_{20}H_{18}O_6$ 을 갖는 분자량 354.3629인 화합물로서, 고삼(苦蔘, [Sophora flavescens] Aiton) 중 특히 고삼 뿌리에 함유된 플라보노이드(Flavonoid) 계열 화합물이다. 상기 "플라보노이드"는 식물에 널리 함유되어 있는 노란색 계통의 색소로, 페닐기 2개가 C3사슬을 매개하여 결합한 탄소골격구조로 되어 있고, 생체 내에서 다양한 활성을 지니는 물질로 알려져있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 개체에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미하는 것으로, "약학적으로 허용가능한 염"이란 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 통상적으로 금속염, 유기 염기와 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다.

[43] 본 발명의 "캄페롤(kaempferol)"은 화학식 $C_{15}H_{10}O_6$ 을 갖는 분자량 286.24인 화합물로서, 플라보노이드 계열 화합물에 속한다. 자연계에서는

퀘르세틴(quercetin)에 이어서 많이 존재하며, 브로콜리, 포도, 사과, 양파 등에 배당체 형태로 함유되어 있다. 캄페롤은 산화 스트레스를 줄임으로써 항산화제 역할을 하며, 섭취시 다양한 암의 위험을 줄일 수 있다고 알려져 있다(Kim and Choi, 2013).

- [44] 본 발명의 "고삼(苦蔘, [*Sophora flavescens*] Aiton)"은 쌍떡잎 식물 장미목 콩과에 속하는 여러해살이풀이다. 도둑놈의 지팡이, 너삼, 뱀의 정자나무라고도 한다. 키는 80-120cm 정도로 전체에 노란색의 짧은 털이 있고, 뿌리는 비대하며 매우 쓴맛이 난다. 한방에서는 이 뿌리를 말린 것을 고삼이라고 하는데, 소화불량, 황달, 치질 등에 처방하는 것으로 알려져 있다. 민간에서는 줄기나 잎을 달여서 살충제로 쓰기도 한다.
- [45] 본 발명의 용어 "심혈관 대사 질환"이란, 생체내의 당질, 지질 등의 대사 불균형에 의해 발생하는 질환을 의미하는 것으로, 심혈관 질환 및 대사성 질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [46] 상기 "심혈관 질환"은 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환으로, 주요 질병으로는 고혈압, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 죽상경화증, 뇌졸중, 부정맥 등이 있으며, 혈관 내 콜레스테롤의 축적(총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 중성지방의 증가, HDL 콜레스테롤의 감소)이 대표적인 원인으로 꼽힐 수 있다.
- [47] 상기 "대사성 질환"은 특별히 제한되지 않으나, 당질 대사 이상 또는 지질 대사 이상에 의한 대사성 질환을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 용어 "당질 대사 이상에 의한 대사성 질환"이란 생체 내 당질의 대사과정에 있어서 발생한 불균형에 의한 질환을 말하는 것으로서, 특별히 이에 제한되지 않으나, 당뇨병, 당뇨병전증, 2형 당뇨병 등을 포함할 수 있다. 또한, 구체적으로, "지질 대사 이상에 의한 대사성 질환"이란 생체 내 지질의 대사과정에 있어서 발생한 불균형에 의한 질환을 말하는 것으로서, 특별히 이에 제한되지 않으나, 심혈관 질환과 이상지질혈증, 비만 등을 포함할 수 있다.
- [48] 본 발명의 용어 "독성"이란, "화학적, 물리적 또는 생물학적 작용물이 생명체와 생태계에 끼치는 악영향"을 의미한다.
- [49] 본 발명의 용어 "LDL(Low density lipoprotein)"이란, 간에서 생산된 초저밀도 지단백질(VLDL; very low density lipoprotein)이 혈관 내에서 분해되어 만들어진 것으로서, 간이나 장의 콜레스테롤을 조직으로 운반하는 지단백질의 하나로 분류된다. apolipoprotein B-100과 Apo E, 비타민 E 및 카로티노이드와 같은 항산화 비타민을 포함하고 있으며, 조직세포에서 세포막, 호르몬을 합성 또는 저장한다. LDL은 세포막에 있는 수용체 LDLR(Low density lipoprotein receptor)와 결합하여 세포내로 운반되며 리소좀에서 가수분해 되는데, 수용체에 이상이 생기면 고 콜레스테롤 혈증을 유발하게 된다. LDL은 콜레스테롤을 많이 함유하고 있으므로 혈액 내에 증가하게 되면 관상동맥질환과 심장발작의 위험이 높아질 수 있다.

- [50] 본 발명의 용어 "LDLR(Low density lipoprotein receptor)"이란, 혈중 주요콜레스테롤의 운반체인 LDL과 결합하는 단백질로서, 콜레스테롤이 풍부한 LDL의 엔도사이토시스(endocytosis)를 매개하여 LDL의 혈장 레벨을 유지하는 역할을 한다. LDLR은 LDL 입자의 외부 인지질 층에 삽입된 apoprotein B100을 인식하는 세포-표면 수용체로서, LDLR을 통한 LDL의 엔도사이토시스는 모든 유핵 세포에서 일어나지만, 주로 간에서 혈중 LDL의 약 70%를 제거한다.
- [51] 본 발명의 일 실시예에서는, 노르안하이드로이카리틴의 LDLR 생성 증가 효과를 확인하기 위해, HepG2 세포에 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리 후, RealTime-PCR을 통해 LDLR mRNA 양을 확인하였다(도 4). 이를 통해, 노르안하이드로이카리틴은 LDLR 생성 증가 효과가 있으므로, 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮출 수 있고, 따라서 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [52] 본 발명의 용어 "PCSK9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)"이란, 인간의 1번 염색체 상의 PCSK9 유전자에 의해 암호화 되는 효소로서, 많은 조직과 세포 유형에 편재한다. PCSK9은 LDL의 수용체 LDLR에 결합하는데, 간 및 다른 세포막에서 LDLR-LDL 결합체가 세포 내로 흡수된 후 PCSK9이 LDLR에 결합할 경우, PCSK9이 LDLR을 분해하여 더 이상 LDLR이 LDL 입자와 결합하기 세포막 표면으로 재생되는 것을 막는다. 이에, PCSK9을 차단하거나 생성을 억제하면, 더 많은 LDLR이 재생되고 혈중 LDL 입자의 농도를 낮출 수 있다.
- [53] 본 발명의 일 실시예에서는, 노르안하이드로이카리틴의 PCSK9 생성 억제 효과를 확인하기 위해, HepG2 세포에 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리 후, RealTime-PCR을 통해 PCSK9 mRNA 양을 확인하였다(도 3). 이를 통해, 노르안하이드로이카리틴은 PCSK9의 생성을 억제하여 LDLR을 증가시키고, 혈중 콜레스테롤의 수치를 감소시킴으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [54] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 노르안하이드로이카리틴의 처리에 따른 PCSK9 유전자의 발현 억제 효과를 확인하기 위해, HEK293T 세포 추출물에 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리하고, luciferase assay를 통해 PCSK9의 발현이 억제되는지 확인하였다(도 5). 이를 통해, 노르안하이드로이카리틴은 PCSK9의 유전자의 발현을 억제하여 LDLR을 증가시키고, 혈중 콜레스테롤 수치의 감소시킴으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [55] 본 발명의 용어 "AMPK(AMP-activated protein kinase)"란, ATP 대 AMP의 비율을 모니터링 함으로써 낮은 에너지 상태를 감지하는 조절적 β/γ 서브유닛 및 촉매적 α 서브유닛을 포함하는 효소로서, 세포의 에너지 항상성을 유지하는 역할을 한다. AMPK는 근육 수축 및 운동 시 AMPK의 상위효소인 LKB1 및 CaMKK(Ca²⁺ /calmodulin-dependent kinase kinase)에 의한 트레오닌 172의

인산화에 의해 활성화된다(phospho-AMPK, pAMPK). AMPK의 활성화에 따라, 간 및 골격근에서의 지방산 산화, 글루코스 섭취의 촉진 및 콜레스테롤 합성의 억제 등의 효과가 나타난다. 구체적으로, 골격근 내에서의 글루코스의 섭취는 원형질막으로의 GLUT4의 이동(translocation)이 향상됨으로써 일어난다. 또한, AMPK는 지방 조직에서 유래된 2가지 호르몬인 렙틴(leptin)과 아디포넥틴(adiponectin)의 표적 분자이며, 상기 호르몬들은 에너지 대사 및 글루코스 항상성의 주요 조절인자이다(Ewart and Kennedy, 2012; Penumathsa et al. 2009; Samovski et al. 2012).

- [56] 본 발명의 용어 “PPAR(Peroxisome proliferator activated receptor)”는 핵수용체(nuclear hormone receptor) superfamily 에 속하는 전사 인자로서, 지방대사 및 당대사를 조절하며 세포의 증식과 분화를 조절하는 역할을 한다. PPARs는 α , β , γ 세 가지의 형태가 알려져 있는데, 이들은 각각 서로 다른 세 유전자에 의해 발현된다. PPAR α 의 표적 유전자 대부분은 지방산의 세포 내 유입과 지방대사물의 산화를 조절하는 중요한 효소들인 반면, PPAR γ 은 지방 조직에서 다량으로 발현하여 지방세포의 분화와 잉여 에너지를 지방형태로 저장 및 인슐린과 당의 항상성 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [57] 본 발명의 일 실시예에서는, 노르안하이드로이카리틴 처리에 따른 PPAR α 와 γ 발현 증가 효과를 확인한 결과, 노르안하이드로이카리틴을 처리한 군에서 그 농도 의존적으로 PPAR α 와 γ 의 발현이 증가함을 확인하였다(도 7). 이로부터, 노르안하이드로이카리틴은 PPAR α 와 γ 의 발현을 증가시켜 혈중 지방산의 흡수 및 이화 작용을 촉진함으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [58] 본 발명의 용어 “SREBP(sterolregulatory elementbinding protein)”는 지방산과 콜레스테롤의 생합성 경로에 관련되는 효소들을 활성화하여 간에서 지방산과 콜레스테롤 합성을 조절하는 중요한 전사활성인자이다. SREBP에는 1a, 1c 및 2의 세 가지 종류가 있으며, SREBP-1a와 SREBP-1c는 주로 지방산 및 중성지방의 합성에 관여하고 SREBP-2는 콜레스테롤 대사에 관여하는 것으로 알려져 있다. 인슐린 저항성으로 인해 발생하는 고인슐린혈증은 간의 SREBP-1c의 발현을 증가시킴으로써 지방산의 생합성을 증가시키고 결과적으로 간조직에 중성지방의 축적을 유발한다. 또한, SREBP-1c는 지방합성 효소인 acetyl-CoA carboxylase(ACC)와 fatty acid synthase(FAS) 유전자의 발현을 증가시키는 전사인자로, ACC와 FAS의 발현을 증가시켜 간세포에서 지방산의 축적을 유발한다.
- [59] 한편, SREBP-1c의 활성화는 상기 “AMP-activated protein kinase(AMPK)”에 의해 억제되는데, AMPK는 serine/threonine kinase의 일종으로 세포 내 에너지(ATP)가 결핍될 때 활성화되어 세포 내 에너지 생산을 증가시키는 효소이다. 활성화된 AMPK는 지방산의 베타-산화(beta-oxidation)와 같은 ATP를 생성시키는 이화과정을 자극하고, 지방생성과 같은 ATP를 소비하는 과정을 억제한다.

그러므로 AMPK 활성화는 SREBP-1c 활성의 하향조절을 통해 지방합성 효소의 발현을 억제하여 지방합성을 억제한다.

- [60] 본 발명의 일 실시예에서는, HEK293T 세포에 노르안하이드로이카리틴과 캄페롤을 각각 처리하고, 발광효소 분석(luciferase assay)를 통해 SREBP의 발현이 억제되는지 여부를 확인한 결과, 동일 농도의 캄페롤에서 대조군 대비 SREBP1 및 2 발광효소 활성이 오히려 증가한 것과 달리, 노르안하이드로이카리틴은 캄페롤 뿐만 아니라 대조군 대비 SREBP1 및 2 발광효소 활성이 현저하게 감소하였음을 확인하였다(도 8). 이로부터, 노르안하이드로이카리틴은 SREBP 유전자의 발현을 하향 조절하여 간에서 지방산과 콜레스테롤의 합성을 억제함으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[61]

- [62] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 스타틴 계열 약물을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [63] 본 발명의 용어 “스타틴(statins)”은 콜레스테롤 생합성의 초기 단계에 관여하는 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) 환원효소의 경쟁적 억제제로 작용하여 혈청 콜레스테롤 농도를 낮추는 약물로, 본 명세서 내에서 “스타틴 계열 약물”과 혼용된다. 상기 스타틴은 간세포에서 콜레스테롤 합성을 억제하고, 저밀도 지질단백질 수용체(Low density lipoprotein receptor, LDLR) 발현을 증가시켜 혈중 LDL-C(low density lipoprotein-cholesterol) 수치를 낮춘다. 이외에도 중성지방 수치의 감소와 HDL-C (high density lipoprotein-cholesterol) 수치를 증가시키는 효과가 있어, 이상지질혈증 환자에서 지질 조절을 위해 일반적으로 사용된다. 본 발명에 있어서, 상기 스타틴은 아토르바스타틴(Atorvastatin), 로수바스타틴(Rosuvastatin), 피타바스타틴(Pitavastatin), 프라바스타틴(Pravastatin), 심바스타틴(Simvastatin), 또는 플루바스타틴(Fluvastatin)일 수 있으나, HMG-CoA 환원효소의 저해 활성을 갖는 한 특별히 이에 제한되지 않는다.

- [64] 다만, 효과와 비례하게 나타나는 스타틴 계열 약물의 부작용으로 간수치 상승과 횡문근 용해증 등이 있으며, 기존 연구를 통해 LDLR은 증가시키지만 그와 비례하게 PCSK9도 함께 증가시킨다는 결과가 나오고 있어 이를 보완할 수 있는 보조약물에 대한 연구가 중요하다. 구체적으로, 상기 부작용은 PCSK9의 동반 증가일 수 있다. 특히, 스타틴으로도 치료목표치의 LDL-C를 얻지 못할 경우 스타틴을 최대용량으로 증량시키기도 하지만, 다른 계열의 약물을 병용하는 병용요법이 권고되며, 고령자 및 중증 환자에서 고농도의 스타틴을 처리하여 약물의 효과를 기대할 수 있지만, 그만큼 부작용이 나타날 수 있기 때문에 이를 보완할 수 있는 보조 약물의 병용투여에 대한 연구가 각광받고 있으며, 병용투여시 LDLR 의 증가 및 PCSK9의 감소 활성을 통해 보다 우수한 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있다.

- [65] 본 발명의 일 실시예에서는, HepG2 세포에서 노르안하이드로이카리틴과 스타틴 병용처리시 동맥경화 관련 단백질 억제 효과를 확인하였으며, PCSK9을 전처리한 HepG2 세포에서 노르안하이드로이카리틴과 스타틴 병용처리시 PCSK9 억제 효과가 있음을 확인하였다(도 9 내지 도 12). 이로부터, 노르안하이드로이카리틴은 스타틴 계열 약물의 처리시 LDLR 뿐 아니라 PCSK9도 증가시키는 부작용을 완화하기 위해 스타틴 계열 약물과 병용처리될 수 있으며, 이 경우 노르안하이드로이카리틴을 단독으로 처리한 경우 대비 pAMPK, LDLR 및 PPAR γ 의 발현이 증가하는 상승작용을 나타내는바, 혈중 지방산 및 콜레스테롤을 감소시킴으로써 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [66] 본 발명의 용어 "약학적 조성물"이란, 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 윤활제, 습윤제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다. 또한, 외용제, 좌제, 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 제형화 할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 구체적으로, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [67] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체, 예컨대 완충제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제 등 당업계에 공지된 담체를 추가로 포함하여 제조할 수 있다. 상기 "약학적으로 허용 가능한 담체"란, 생물체를 자극하지 않으면서 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체, 부형제 또는 희석제를 의미할 수 있으며, 구체적으로, 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)일 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기

담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[68]

[69] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로, 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[70] 또한, 본 발명의 또 다른 하나의 양태로, 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상기 노르안하이드로이카리틴, 약학적으로 허용가능한 염 및 심혈관 대사 질환은 전술한 바와 같다.

[71] 본 발명의 용어 "식품"이란, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강 식품, 발효차 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[72] 본 발명의 용어 "건강 기능(성) 식품"(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없으며, 휴대성이 뛰어난 장점이 있다.

[73] 상기 "건강 식품"(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다.

[74] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 본 발명의 조성물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

[75] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로

사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

- [76] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [77] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [78] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100ml 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.
- [79] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강음료 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [80]
- [81] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로, 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다. 상기 노르안하이드로이카리틴, 약학적으로 허용가능한 염 및 심혈관 대사 질환은 전술한 바와 같다.

- [82] 본 발명의 용어 "예방"이란, 조성물의 투여에 의해 심혈관 대사 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 예방은 본 발명의 약학적 조성물을 사용하여 심혈관 대사 질환의 발병을 억제시키거나 지연시키는 행위를 의미하는 행위로 이해될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [83] 본 발명의 용어 "개선"이란, 심혈관 대사 질환의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [84] 본 발명의 용어 "치료"란, 약학적 조성물의 투여에 의해 심혈관 대사 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 치료는 본 발명의 약학적 조성물을 사용하여 심혈관 대사 질환의 증세를 호전시키거나 병리증상을 경감시키는 행위를 의미하는 행위로 이해될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [85] 상기 "개체"는 심혈관 대사 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는, 인간을 포함한 모두 동물을 의미한다.
- [86] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입 또는 처리하는 것을 의미하며, 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 노르안하이드로이카리틴 및 스타틴 계열 약물을 병용 투여하는 것일 수 있다. 상기 스타틴 계열 약물은 아토르바스타틴(Atorvastatin) 또는 로수바스타틴(Rosuvastatin)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 노르안하이드로이카리틴 및 스타틴 계열 약물은 동시, 순차적, 또는 역순으로 개체에게 병용 투여될 수 있다.
- [87] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있으며, 상기 약학적으로 유효한 양이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하는 것으로, 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 투여하는 경로 및 방식은 특별히 제한되지 않으며, 본 발명의 목적을 달성하기 위해 상기 조성물이 개체 내에 도달할 수 있는 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.
- [88] 본 발명에서 제공하는 약학적 조성물은 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하며, 상기 약학적 조성물은 세포에 대한 독성이 없으면서도 PCSK9 생성 및 PCSK9 유전자 발현을 억제하고, LDLR을 생성하는 효과가 있다.
- [89] 본 발명의 일 실시예에서는, HepG2 세포에 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리 후, RealTime-PCR을 통해 LDLR mRNA 양을 확인하였다(도 4). 그 결과, 노르안하이드로이카리틴은 LDLR 생성 증가 효과가 있으므로, 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮출 수 있고, 따라서 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [90] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, HepG2 세포에 노르안하이드로이카리틴을

농도별로 처리 후, RealTime-PCR을 통해 PCSK9 mRNA 양을 확인하였다(도 3). 그 결과, 노르안하이드로이카리틴은 PCSK9의 생성을 억제하여 LDLR을 증가시키고, 혈중 콜레스테롤의 수치를 감소시킴으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[91] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, PCSK9 프로모터-리포터 구조(promoter-reporter construct)를 형질주입(transfection)한 HEK293T 세포에 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리하고, luciferase assay를 통해 PCSK9의 발현이 억제되는지 확인하였다(도 5). 그 결과, 노르안하이드로이카리틴은 PCSK9의 유전자의 발현을 억제하여 LDLR을 증가시키고, 혈중 콜레스테롤 수치의 감소시킴으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[92] 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[93] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 혼합물의 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 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[94]

[95] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로, 노르안하이드로이카리틴 또는 그의

약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 스타틴 계열 약물의 부작용 완화용 보조제를 제공한다.

- [96] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로, 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의, 스타틴 계열 약물의 부작용 완화용도를 제공한다.
- [97] 상기 노르안하이드로이카리틴, 약학적으로 허용가능한 염 및 스타틴 계열 약물을 전술한 바와 같다.
- [98] 상기 “보조제”는 스타틴 계열 약물과 병용 투여되어 그 부작용을 완화시켜 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 효과를 증진시킬 수 있는 물질을 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 스타틴 계열 약물은 LDLR의 발현 증가뿐만 아니라 그와 비례하게 PCSK9도 함께 증가시키는 부작용이 있는바, 이를 보완하기 위한 보조제로 노르안하이드로이카리틴을 병용 투여하여 LDLR 증가 및 PCSK9을 감소 효과를 동시에 달성하고, 보다 우수한 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있다.
- [99] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로, 노르하이드로이카리틴 및 스타틴 계열 약물을 병용 투여하는 단계를 포함하는, 스타틴 계열 약물의 부작용을 완화시키는 방법을 제공한다. 상기 노르안하이드로이카리틴, 약학적으로 허용가능한 염, 스타틴 계열 약물, 개체 및 투여는 전술한 바와 같다.

[100]

발명의 실시를 위한 형태

- [101] 이하, 본 발명의 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[102]

[103] 실시예 1: 고삼 추출물로부터 노르안하이드로이카리틴 분리

- [104] 음건한 고삼 203 g을 잘게 분쇄하여 100% methanol (MeOH, 1L×3)을 가하여 실온에서 24시간 3회 반복 추출한 후 여과하였다. 얻어진 여액을 감압 농축하여 MeOH 추출물(13.9 g, 추출 수율 6.8%)을 얻었다. 얻은 추출물 1.0 g을 MPLC 기기에 250×20 mm에 YMC ODS AQ HG (220 g)을 충전한 칼럼관에 역상 조건(0-15min 35% MeOH, 15-65 min 35-100% MeOH, 65-90 min 100% MeOH)에서 UV 검출기(254 nm)를 사용하여 총 9개의 분획물(SF Fr. 1-9)을 얻었다. UPLC-QToF-MS분석으로 노르안하이드로이카리틴이 포함된 분획물 SF Fr. 7을 농축하여 PLC2020 prep-HPLC (YMC, Japan)에 역상칼럼 (YMC ODS AQ, 250×20 mm, 5 μ m, Japan)를 사용하여 증류수(A), MeOH (B)의 혼합 용매를 이동상으로 하는 0-5 min 30% (B), 5-35min 60% (B), 35-40 min 100% (B) 조건으로 column chromatography를 실시 하여 노르안하이드로이카리틴을 분리하였다. 분리한 노르안하이드로이카리틴은 UPLC 분석에서 retention time은 5.75분, UV 224 271, nm, high resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS)

값은 353.1055 [M-H]⁻ 분자식은 C₂₀H₁₈O₆를 가졌다.

[105]

[106] 실시예 2: 노르안하이드로이카리틴 처리한 **HepG2** 세포의 세포생존율

[107] 노르안하이드로이카리틴의 세포에 대한 독성을 확인하기 위해, HepG2 세포 (human liver hepatocellular carcinoma)에 캄페롤 및 노르안하이드로이카리틴을 각각 농도별로 처리하고, MTT 검색법을 통해 각 농도에 대한 HepG2 세포의 생존율을 계산하였다.

[108] 구체적으로, HepG2 세포를 소 태아 혈청(Fetal bovine Serum)을 10% 첨가한 DMEM (Welgene Inc.) 배지에 1×10⁵개/ml의 농도로 현탁하여 96-웰 플레이트에 100μl씩 접종하였다. 4시간 경과 후, 캄페롤 및 노르안하이드로이카리틴 시료를 2.5, 5, 10, 20μM의 농도로 웰 플레이트에 각각 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, MTT(5mg/ml)를 웰 플레이트에 5μl씩 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고, DMSO를 웰 플레이트에 100μl씩 첨가하여 반응시킨 후 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 콜레스테롤 합성 저해제인 아토르바스타틴(Atorvastatin, Ato), 로수바스타틴(Rosuvastatin, Ros)을 사용하였고, 세포생존율은 DMSO만을 처리한 음성 대조군의 값을 100%로 하였을 때 그에 대한 상대적인 값으로서, 하기 수학식에 따라 계산하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[109]

[110] [수식1]

$$\text{세포생존율(\%)} = [(\text{추출물 처리한 OD570 nm 값})/(\text{음성 대조군 OD570 nm 값})] \times 100$$

[111]

[112] 도 1에서 알 수 있듯이, 노르안하이드로이카리틴은 대조군인 아토르바스타틴 또는 로수바스타틴에 비해 동일 농도에서 더 높은 세포생존율을 나타내었고, 특히, 20μM의 최고 농도에서도 90% 이상의 높은 세포생존율을 나타내었다. 이를 통해, 노르안하이드로이카리틴은 세포독성이 낮으므로 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서 안전성이 있음을 확인하였다.

[113]

[114] 실시예 3: 노르안하이드로이카리틴 처리한 **HEK293T** 세포의 세포생존율

[115] 노르안하이드로이카리틴의 세포에 대한 독성을 확인하기 위해, HEK293T (human embryonic kidneys)에 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리하고, MTT 검색법을 통해 노르안하이드로이카리틴의 각 농도에 대한 세포의 생존율을 계산하였다.

[116] 구체적으로, HEK293T 세포를 소 태아 혈청(Fetal bovine Serum)을 10% 첨가한 DMEM (Welgene Inc.) 배지에 1×10⁵개/ml의 농도로 현탁하여 96-웰 플레이트에 100μl씩 접종하였다. 4시간 경과 후, 노르안하이드로이카리틴 시료를 2.5, 5, 10, 20μM의 농도로 웰 플레이트에 각각 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, MTT

(5mg/ml)를 웰 플레이트에 5 μ l씩 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고, DMSO를 웰 플레이트에 100 μ l씩 첨가하여 반응시킨 후 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 콜레스테롤 합성 저해제인 아토르바스타틴(Atorvastatin), 로수바스타틴(Rosuvastatin)을 사용하였고, 세포생존율은 DMSO만을 처리한 음성 대조군의 값을 100%로 하였을 때 그에 대한 상대적인 값으로서, 상기 수학적 식 1에 따라 계산하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

- [117] 도 2에서 알 수 있듯이, 노르안하이드로이카리틴은 대조군인 아토르바스타틴 또는 로수바스타틴에 비해 동일 농도에서 비슷하거나 더 높은 세포생존율을 나타내었고, 20 μ M의 최고 농도에서도 90% 이상의 높은 세포생존율을 나타내었다. 이를 통해, 노르안하이드로이카리틴은 세포독성이 낮으므로 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서 안전성이 있음을 확인하였다.

[118]

- [119] 실시예 4: HepG2 세포에서 노르안하이드로이카리틴의 PCSK9 생성 억제 효과

- [120] PCSK9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)은 지질 대사에 관여하는 효소로서, 간 또는 다른 세포막에서 LDL(low density lipoprotein)과 결합된 LDLR(low density lipoprotein receptor)에 부착되어 LDLR을 분해함으로써, LDLR이 다시 세포막으로 재생되어 세포 밖의 LDL을 흡수할 수 없도록 한다. 따라서, PCSK9의 억제는 LDLR을 증가시키고 세포 밖의 LDL 및 콜레스테롤 수치를 낮춤으로써, 지질 대사 관련 질환을 완화할 수 있다. 이에, 노르안하이드로이카리틴의 PCSK9 생성 억제 효과를 확인하기 위해, HepG2 세포에 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리 후, RealTime-PCR을 통해 PCSK9 mRNA의 상대적인 양을 확인하였다.

- [121] 구체적으로, HepG2 세포를 2.5 $\times 10^5$ 개/ml 농도로 현탁하여 23-웰 플레이트에 1ml씩 접종한 후, 하루 동안 유지하였다. 켐페롤 및 노르안하이드로이카리틴을 2.5, 5, 10, 20 μ M씩 웰 플레이트에 처리하고, 24시간 동안 배양한 후 RNA를 회수 및 정량하여 -70°C에 보관하였다. 그 후 RNA를 cDNA로 합성하고 Real time-PCR 분석을 통해 PCSK9 mRNA의 양을 확인하였다. DMSO만을 처리한 군을 음성 대조군으로 사용하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

- [122] 도 3에서 알 수 있듯이, 노르안하이드로이카리틴은 대조군인 아토르바스타틴 또는 로수바스타틴에 비해 동일한 농도에서 우수한 PCSK9 생성 억제 효과를 보였고, 특히 2.5 및 5 μ M의 낮은 농도에서도 대조군보다 현저히 우수한 PCSK9 생성 억제 효과를 나타내었다. 이를 통해, 노르안하이드로이카리틴은 PCSK9의 생성을 억제하여 LDLR을 증가시키고 혈중 콜레스테롤 수치를 감소시킴으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 확인하였다.

[123]

- [124] 실시예 5: HepG2 세포에서 노르안하이드로이카리틴의 LDLR 생성 효과

- [125] LDLR은 혈중 콜레스테롤의 운반체인 LDL과 결합하는 단백질로서, LDL과

결합하여 세포 내로 LDL을 흡수함으로써 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮출 수 있고, 따라서 심혈관 대사 질환을 완화할 수 있다. 이에, 노르안하이드로이카리틴의 LDLR 생성 증가 효과를 확인하기 위해, HepG2 세포에 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리 후, RealTime-PCR을 통해 LDLR mRNA의 상대적인 양을 확인하였다.

[126] 구체적으로, HepG2 세포를 2.5×10^5 개/ml 농도로 현탁하여 23-웰 플레이트에 1ml씩 접종한 후, 하루 동안 유지하였다. 캄페롤 및 노르안하이드로이카리틴을 2.5, 5, 10, 20 μ M씩 웰 플레이트에 처리하고, 24시간 동안 배양한 후 RNA를 회수 및 정량하여 -70°C에 보관하였다. 그 후 RNA를 cDNA로 합성하고 Real time-PCR 분석을 통해 PCSK9 mRNA의 양을 확인하였다. DMSO만을 처리한 군을 음성 대조군으로 사용하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[127] 도 4에서 알 수 있듯이, 노르안하이드로이카리틴은 모든 농도에서 모체인 캄페롤과 비슷하거나 보다 높은 LDLR 생성 효과를 나타내고, 대조군인 아토르바스타틴과 비교하여 10 μ M에서 비슷한 LDLR 생성 효과를 나타내었다. 이를 통해, 노르안하이드로이카리틴은 LDLR 생성 증가 효과가 있으므로, 혈중 콜레스테롤의 수치를 낮출 수 있고, 따라서 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 확인하였다.

[128]

[129] 실시예 6: PCSK9 프로모터-리포터 구조(promoter-reporter construct)를 형질주입(transfection)한 HEK293T 세포에서 노르안하이드로이카리틴의 처리에 따른 PCSK9 유전자의 발현 억제 효과

[130] 노르안하이드로이카리틴의 PCSK9 유전자의 발현 억제 효과를 확인하기 위해, HEK293T 세포에 노르안하이드로이카리틴을 농도별로 처리하고, 발광효소 분석(luciferase assay)을 통해 PCSK9의 발현이 억제되는지 확인하였다.

[131] i) PCSK9 프로모터 유전자 부위에 KpnI 및 XhoI 제한효소 부위를 포함하도록 프라이머를 제작한 후 PCR(polymerase chain reaction)하고, 아가로스 겔에 전기영동을 시행하여 PCSK9 프로모터 부위 DNA를 분리하였다. 반딧불이 발광효소를 리포터(reporter) 유전자로 포함하는 pGL4.14-[luc2/Hygro] 벡터(vector)를 동일한 제한효소(KpnI 및 XhoI)로 처리한 후 아가로스 겔 전기영동 및 겔 추출(gel extraction)을 수행하여 분리하였다. 순수하게 분리된 PCSK9 프로모터 유전자 부위와 pGL4.14-[luc2/Hygro] 벡터는 In-fusion DNA ligase(Takara)를 이용하여 50에서 1시간 동안 반응시킨 후, E. coli에 형질전환하여 PCSK9 프로모터가 삽입된 프로모터-리포터 구조(promoter-reporter construct)를 제조하였으며, 이를 pGL4.14-PCSK9 이라 명명하였다.

[132] ii) PCSK9 프로모터 유전자의 전사 활성을 측정하기 위하여, HEK293T 세포에 pGL4.14-PCSK9를 형질주입시킨 후, 세포 추출물의 발광효소 활성을 측정하였다. DNA-lipofectamine complex는 0.1 μ g의 promoter-reporter construct와

lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 제조하였다. DNA와 lipofectamine 2000이 complex를 제조하는 과정에서 opti-MEM 배지(Invitrogen)를 사용하였다. HEK293T 세포는 DNA를 가하기 직전 세포의 수를 확인하여 12-웰 플레이트에 2.5×10^5 개/ml의 농도로 1ml씩 준비하였다. DNA-lipofectamine complex를 HEK 293T 세포에 조심스럽게 섞은 후 37°C 인큐베이터에서 6시간 반응시켰다. 이후 배지를 갈아주면서 형질주입이 된 세포를 찾는 작업을 진행하였고, 발광효소 테스트(luciferase test)를 통해 PCSK9이 형질주입된 HEK293T세포를 찾을 수 있었다. 반응이 끝난 HEK293T 세포는 실험군에 따라 노르안하이드로이카리틴을 2.5, 5, 10, 20 μ M 농도로 처리한 후, 18시간 동안 배양하였다.

[133] iii) 18시간의 배양이 끝난 후, PBS로 세포를 1회 세척한 후 발광효소 시약(luciferase reagent)을 각 웰에 적당량 가한 후 플레이트를 15분 진탕해준 후 상층액을 얻어내 전사 활성을 측정하였다. Passitive lysis buffer를 사용하였으며, 발광효소 활성은 microplate luminometer(Tecan)을 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 duplicate로 3회 수행하였다. 프로모터 전사활성은 대조군에 대한 상대적인 전사 활성을 형질주입 효율로 보정하여 나타내었으며 통계처리는 student's t-test를 사용하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[134] 도 5에서 알 수 있듯이, 노르안하이드로이카리틴은 대조군에 비하여 낮은 농도에서도 PCSK9 발광효소 활성이 보다 더 감소되었고, 노르안하이드로이카리틴의 농도에 의존적으로 PCSK9 발광효소 활성이 감소하는 것으로 보아, 노르안하이드로이카리틴의 농도에 비례하게 PCSK9 유전자의 발현도 감소할 것임을 확인하였다. 이를 통해, 노르안하이드로이카리틴은 PCSK9의 유전자의 발현을 억제하여 LDLR을 증가시키고 혈중 콜레스테롤 수치의 감소시킴으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 확인하였다.

[135]

[136] **실시예 7: 면역블롯 분석**

[137] 노르안하이드로이카리틴의 PCSK9 발현 억제 및 LDLR 발현 증가 효과를 확인하기 위해, PCSK9 및 LDLR을 표적으로 하는 면역블롯(immunoblotting)을 수행하여 그 발현 정도를 비교하였다. β -actin을 대조군으로 사용하였다.

[138] 100mm 페트리디쉬에 1×10^6 개의 HepG2 세포를 분주하고, 노르안하이드로이카리틴을 농도별 (5, 10, 20 μ M)로 처리한 후 세포를 배양용기로부터 떼어내어 단백질 분해효소 저해제 (Protease inhibitor cocktail, Roche)를 함유한 단백질 용출용액(Protein extraction solution(NP40), ELPIS BIOTECH, Korea)을 사용하여 균질화 하였다.

[139] 전체 단백질을 준비하기 위해, 상기 세포를 RIPA 용해 버퍼(50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM 소듐 플루오라이드, 2 mM 소듐 오르토바나테이트, 1% NP-40, 0.1% 소듐 도데실 설페이트[SDS], 1mM

페닐메틸설포닐 플루오라이드[PMSF], 및 단백질 억제제 콕테일 [Roche Diagnostics, Heidelberg, Germany])에서 추출하였다. 상기 용해물의 단백질 농도는 Bio-Rad dye-binding micro assay를 사용하여 측정하였다. 면역블롯을 위해, 30 μ g의 세포 용해물을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)으로 분리하였다. 단백질을 Hybond-ECL 니트로셀룰로오스 멤브레인(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) 위에 옮겼다. 상기 멤브레인은 0.1% Tween 20 및 5% 탈지분유를 함유하는 TBS(10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl)로 블로킹하였으며, 블로킹 버퍼에 희석된 1차 항체; anti-PCSK9 (sc-515082, Santa cruz), anti-LDLR (sc-18823, Santa cruz), anti- β -actin (#4967, cell signaling)와 4에서 하룻밤 인큐베이트하였다. 상기 멤브레인을 세척하고 적절한 2차 항체; goat-anti-rabbit IgG(H+L) (Jackson; 111-035-003), goat-anti-mouse IgG(H+L) (sc-2005, Santa cruz)로 실온에서 1시간 동안 인큐베이트하였다. HRP-컨쥬게이트된 2차 항체를 ECL 검출 시약을 사용하여 검출하였다.

[140] 도 6에서 알 수 있듯이, 노르안하이드로이카리틴을 처리한 세포는 농도 의존적으로 PCSK9 발현이 감소되었고, 농도 의존적으로 LDLR 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 노르안하이드로이카리틴은 PCSK9의 발현을 억제하여 LDLR을 증가시키고 혈중 콜레스테롤 수치의 감소시킴으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 확인하였다.

[141]

[142] 실시예 8: HepG2 세포에서 노르안하이드로이카리틴의 PPAR 생성 효과

[143] 노르안하이드로이카리틴의 PPAR α 와 γ 발현 증가 효과를 확인하기 위해,

PPAR α 프라이머를 이용한 PCR과, PPAR α 및 γ 를 표적으로 하는 면역형광염색법(immunohistochemistry)을 수행하여 그 발현 정도를 확인하였다.

[144] 실시예 4의 방법으로 RNA를 합성한 cDNA를 이용하여, Realtime-PCR 분석을 통해 PPAR α 와 γ mRNA의 양을 확인하였다. DMSO만을 처리한 군을 음성 대조군으로 사용하였다. 또한, 면역형광염색법(immunohistochemistry)은 HepG2 세포를 슬라이드 챔버에 부착시킨 후, 노르안하이드로이카리틴을 20 μ M로 처리하여 배양하였다. 포르말린으로 고정시킨 후, PPAR α 및 γ 를 표적으로 하는 항체를 이용하여 염색하고, DAPI를 처리하여 핵을 염색하였으며, 공초점현미경을 이용하여 형광발현 정도를 확인하였다.

[145] 도 7에서 알 수 있듯이, 노르안하이드로이카리틴을 처리한 군에서 그 농도 의존적으로 PPAR α 와 γ 의 발현이 증가함을 확인하였다. 즉, 이를 통해 노르안하이드로이카리틴은 PPAR α 와 γ 의 발현을 증가시켜 혈중 지방산의 흡수 및 이화 작용을 촉진함으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[146]

[147] 실시예 9: SREBP 프로모터-리포터 구조(promoter-reporter construct)를 형질주입(transfection)한 HEK293T 세포에서 노르안하이드로이카리틴 처리에

따른 SREBP 유전자의 발현 억제 효과

- [148] 노르안하이드로이카리틴의 SREBP 유전자의 발현 억제 효과를 확인하기 위해, HEK293T 세포에 노르안하이드로이카리틴과 캄페롤을 처리하고, 발광효소 분석(luciferase assay)을 통해 SREBP의 발현이 억제되는지 확인하였다.
- [149] i) SREBP1과 2 프로모터 유전자 부위에 KpnI 및 XhoI 제한효소 부위를 포함하도록 프라이머를 제작한 후 PCR(polymerase chain reaction)하고, 아가로스 겔에 전기영동을 시행하여 SREBP 프로모터 부위 DNA를 분리하였다. 반딧불이 발광효소를 리포터(reporter) 유전자를 포함하는 pGL4.14-[luc2/Hygro] 벡터(vector)를 동일한 제한효소(KpnI 및 XhoI)로 처리한 후 아가로스 겔 전기영동 및 겔 추출(gel extraction)을 수행하여 분리하였다. 순수하게 분리된 PCSK9 프로모터 유전자 부위와 pGL4.14-[luc2/Hygro] 벡터는 In-fusion DNA ligase(Takara)를 이용하여 1시간 동안 반응시킨 후, E. coli에 형질전환하여 SREBP 프로모터가 삽입된 프로모터-리포터 구조(promoter-reporter construct)를 제조하였으며, 이를 pGL4.14-SREBP 이라 명명하였다.
- [150] ii) SREBP 프로모터 유전자의 전사 활성을 측정하기 위하여, HEK293T 세포에 pGL4.14-SREBP를 형질주입시킨 후, 세포 추출물의 발광효소 활성을 측정하였다. 실시예 6과 동일한 방법으로 DNA-lipofectamine complex를 HEK293T세포에 형질주입하였고, 발광효소 테스트(luciferase test)를 통해 SREBP이 형질주입된 HEK293T세포를 찾을 수 있었다. 반응이 끝난 HEK293T 세포는 실험군에 따라 시료를 처리한 군과 그렇지 않은 군으로 나누고, 시료를 처리한 후, 18시간 동안 배양하였다. 이후 실시예 6의 방법으로, 발광효소 활성을 측정하였다. 모든 실험은 duplicate로 3회 수행하였으며, 프로모터 전사활성은 대조군에 대한 상대적인 전사 활성을 형질주입 효율로 보정하여 나타내었으며, 통계처리는 student's t-test를 사용하였다.
- [151] 도 8로부터 알 수 있듯이, 동일 농도의 캄페롤에서 대조군 대비 SREBP1 및 2 발광효소 활성이 오히려 증가한 것과 달리, 노르안하이드로이카리틴은 캄페롤 뿐만 아니라 대조군 대비 SREBP1 및 2 발광효소 활성이 현저하게 감소하였음을 확인하였다. 이로부터, 노르안하이드로이카리틴은 SREBP 유전자의 발현을 하향 조절하여 간에서 지방산과 콜레스테롤의 합성을 억제함으로써, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [152]
- [153] 실시예 10: HepG2 세포에서 노르안하이드로이카리틴과 스타틴 병용처리시 동맥경화 관련 단백질 억제 효과
- [154] 실시예 7의 방법으로 분주한 세포에 노르안하이드로이카리틴과 스타틴(아토르바스타틴, 로수바스타틴)을 단독 혹은 동시에 처리하여 단백질을 추출하였다. 각 30 μ g의 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 전기영동하고, 멤브레인에 부착한 후, 각각의 항체: phospho-AMPK, PCSK9, LDLR, PPAR γ 를 이용하여 단백질 발현량을 확인하였다.

- [155] 그 결과, 도 9에서 알 수 있듯이, 아토르바스타틴과 로수바스타틴 단독을 각각 처리하였을 때 증가한 PCSK9의 양이 노르안하이드로이카리틴을 병용처리한 세포에서는 감소한 것을 확인하였다. 반면, 아토르바스타틴과 로수바스타틴을 각각 단독으로 처리한 경우보다 노르안하이드로이카리틴과 스타틴을 병용처리한 경우 pAMPK, LDLR 및 PPAR γ 단백질의 발현양이 증가한 것을 확인하였다.
- [156] 즉, 노르안하이드로이카리틴은 스타틴 계열 약물의 처리시 LDLR 뿐 아니라 PCSK9의 발현도 증가시키는 부작용을 완화하기 위해 스타틴 계열 약물과 병용처리될 수 있으며, 이 경우 노르안하이드로이카리틴을 단독으로 처리한 경우 대비 pAMPK, LDLR 및 PPAR γ 의 발현이 증가하는 상승작용을 나타내는바, 혈중 지방산 및 콜레스테롤을 감소시킴으로써 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [157]
- [158] 실시예 11: PCSK9을 전처리한 HepG2 세포에서 노르안하이드로이카리틴과 스타틴 병용처리시 PCSK9 억제 효과
- [159] 실시예 7의 방법으로 분주한 세포에 PCSK9을 2 μ g/ml씩 전처리한 후, 노르안하이드로이카리틴과 스타틴 계열 약물(아토르바스타틴, 로수바스타틴)을 단독 혹은 동시에 처리하여 단백질을 추출하였다. 추출된 각 30 μ g의 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 전기영동하고, 멤브레인에 부착한 후, 각각의 항체: PCSK9, LDLR를 이용하여 단백질 발현량을 확인하였다. 그리고, LDLR mRNA 발현량을 확인하기 위하여 RNA를 추출하여 Realtime PCR을 진행하였다.
- [160] 그 결과, 도 10에서 알 수 있듯이, HepG2 세포에서 PCSK9 전처리에 의해 LDLR이 감소함을 확인하였다. 또한, PCSK9을 전처리한 후 각각의 스타틴을 단독 처리한 세포에서는 LDLR 발현이 감소하였으나, 노르안하이드로이카리틴과 각각의 스타틴을 병용처리한 세포에서는 LDLR 발현이 현저히 증가함을 확인하였다. 아울러, PCSK9을 전처리하고 각각의 스타틴을 단독 처리한 경우 PCSK9의 발현양이 오히려 증가하였으나, 노르안하이드로이카리틴을 병용처리한 세포에서는 PCSK9 발현이 현저히 감소함을 확인하였다.
- [161] 즉, 노르안하이드로이카리틴은 스타틴 계열 약물의 처리시 LDLR 뿐 아니라 PCSK9의 발현도 증가시키는 부작용을 완화하기 위해 스타틴 계열 약물과 병용처리될 수 있으며, 이 경우 PCSK9 발현은 오히려 감소시키면서 LDLR 발현은 단독 처리한 경우 대비 현저한 수준으로 향상시킬 수 있는바, 혈중 지방산 및 콜레스테롤을 감소시킴으로써 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [162]
- [163] 실시예 12: HepG2 세포에서 노르안하이드로이카리틴과 피타바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴, 또는 플루바스타틴을 병용처리시 동맥경화 관련

단백질 발현

[164] 실시예 7의 방법으로 분주한 세포에 노르안하이드로이카리틴과 각각의 스타틴(프라바스타틴, 피타바스타틴, 플루바스타틴, 또는 심바스타틴)을 단독 혹은 동시에 처리하여 단백질을 추출하였다. 각 30 μ g의 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 전기영동하고, 멤브레인에 부착한 후, 각각의 항체: PCSK9, LDLR를 이용하여 단백질 발현량을 확인하였다.

[165] 그 결과, 도 11에서 알 수 있듯이, HepG2 세포에서 각각의 스타틴을 단독 처리한 세포에서보다 노르안하이드로이카리틴과 각각의 스타틴을 병용처리한 세포에서 PCSK9 발현이 현저히 감소함을 확인하였다. 이를 수치화한 값은 다음 표 1에 나타내었다 [표 1].

[166] [표1]

심바스타 틴	피타바스 타틴	플루바스 타틴	프라바스 타틴	노르안하이드로이 카리틴	PCSK9
5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	20 μ M	
-	-	-	-	-	1 $\pm$ 0.04
-	-	-	-	+	0.34 $\pm$ 0.02
-	-	-	+	-	1.9 $\pm$ 0.06
-	-	+	-	-	1.63 $\pm$ 0.02
-	+	-	-	-	1.59 $\pm$ 0.02
+	-	-	-	-	1.85 $\pm$ 0.11
-	-	-	+	+	0.3 $\pm$ 0.02
-	-	+	-	+	0.29 $\pm$ 0.02
-	+	-	-	+	0.28 $\pm$ 0.03
+	-	-	-	+	0.24 $\pm$ 0.04

[167]

[168] 아울러, 도 12에서 알 수 있듯이, 각각의 스타틴(아토바스타틴, 로수바스타틴, 프라바스타틴, 피타바스타틴, 플루바스타틴, 또는 심바스타틴)을 단독처리한 세포에서보다 노르안하이드로이카리틴과 각각의 스타틴을 병용처리한 세포에서 LDLR이 현저히 증가함을 확인하였다.

[169] 즉, 노르안하이드로이카리틴은 스타틴 계열 약물인 아토르바스타틴, 로수바스타틴, 프라바스타틴, 피타바스타틴, 플루바스타틴, 또는 심바스타틴의 처리시 LDLR 뿐 아니라 PCSK9의 발현도 증가시키는 부작용을 완화하기 위해 스타틴 계열 약물과 병용처리 될 수 있으며, 이 경우 PCSK9 발현은 오히려 감소시키면서 LDLR 발현은 단독 처리한 경우 대비 현저한 수준으로 향상시킬

수 있는바, 혈중 지방산 및 콜레스테롤을 감소시킴으로써 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[170]

[171] 실시예 13: PCSK9을 주입한 마우스 carotid-ligation 모델에서
노르안하이드로이카리틴의 동맥경화 저해효과

[172] <실시예 13-1> 마우스 동맥경화 모델 제작

[173] 6-8주령 마우스의 경동맥(carotid artery)에 ligation을 하여 mechanic한 스트레스를 주어 염증, 혈전증(thrombosis), 산화적 스트레스 및 shear stress를 유발시키고, 외경동맥(external carotid, EC)의 기능과 구조를 변화시켜 죽상동맥경화증 모델(atherosclerosis model)을 제작하였다(도 13).

[174] 구체적으로, 고지방 식이를 1주일 한 쥐에게 경동맥 ligation을 하는 것으로, 복강 마취 후 LCA(Left common carotid artery)에 대해 ligation을 수행하였다. LCA에 있는 세 개의 branches, 외경동맥(External carotid artery, ECA), 내경동맥(internal carotid artery, ICA), 후두동맥(Occipital artery, OA) 이 세 곳의 branches를 partial ligation 해주고, 이 때 ICA와 OA를 ligation하고 ECA를 따로 ligation을 하였다. Ligation을 수행한 마우스는 심장으로 가는 혈액흐름의 양이 줄고 방향이 바뀌게 되어 죽상동맥경화증 모델을 제작하였다.

[175]

[176] <실시예 13-2> 죽상동맥경화증 모델 마우스에서 노르안하이드로이카리틴
처리에 따른 효과 확인

[177] AAV-PCSK9 Virus(1×10^{11} ifu/ml)와 노르안하이드로 이카리틴(10ug/g/day)을 주사한 후 1주일 뒤에 경동맥 ligation을 수행하였다. Ligation 3주 후 죽상동맥경화증 모델이 완성되었는지를 확인하고, 총 플라크 이미징(gross plaque imaging, 면역형광법(immunofluorescence)을 수행하여 노르안하이드로이카리틴의 동맥경화 저해 효과를 확인하였다.

[178] 먼저 동맥경화 모델이 제대로 만들어졌는지 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과, 도 14에서 알 수 있듯이, WT 마우스 보다 PCSK9 바이러스를 주입해준 Vehicle, 노르안하이드로이카리틴 처리군 마우스의 간 조직에서의 PCSK9의 발현이 증가하였음을 확인하였다.

[179] 또한, 총 플라크 이미징 결과, 도 15에서 알 수 있듯이 Vehicle 군(약 45%) 대비 노르안하이드로이카리틴 처리군(약 20%)에서 죽상 동맥경화 플라크(atherosclerotic plaque) 형성 부분이 현저히 감소한 것을 확인하였다.

[180] 나아가, 면역형광법을 이용하여 노르안하이드로이카리틴의 동맥경화 저해효과를 확인하였다. 구체적으로, 마우스 경동맥을 수득하여 4% PFA에 1일간 고정시킨 후 block을 제작하였다. 혈관 내 염증반응이 진행될수록 동맥경화가 더 악화되므로, 동맥경화 염증반응을 일으키는 대식세포의 마커 F/480 및 염증반응이 일어날 때 분비되는 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1B, MCP-1을 염색하였다. CAP1(1:200), PCSK9(1:100), F4/80(1:100), TNF- α (1:100),

IL-1B(1:100), MCP-1(1:100) 각각에 대한 항체를 이용하여 염색 후, 공초점 현미경을 이용하여 촬영, Bioluminescence를 평가하였다.

- [181] 그 결과, 도 16에서 알 수 있듯이, 노르안하이드로이카리틴을 주입한 군에서 전염증성 마커인 TNF-a, IL-1B, MCP-1의 발현이 감소하였으며, 대식세포(macrophage)의 마커인 F/480의 발현도 감소함을 확인하였다. 또한, 노르안하이드로이카리틴을 주입한 군에서 PCSK9의 발현도 대조군 대비 현저하게 감소되는 것을 확인하였다. 이에 따라 노르안하이드로이카리틴은 혈관 내 염증반응의 진행을 억제하여 동맥경화의 완화 효과가 있으며, PCSK9 발현 감소 효과로 LDLR을 증가시키고 혈중 지방산 및 콜레스테롤을 감소시켜 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

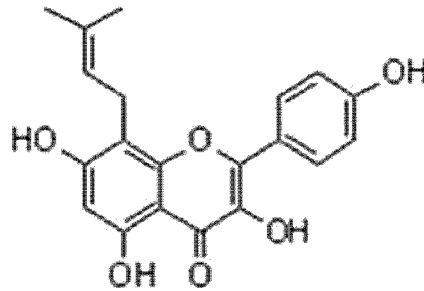
[182]

- [183] 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] 하기 화학식 1로 표시되는 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

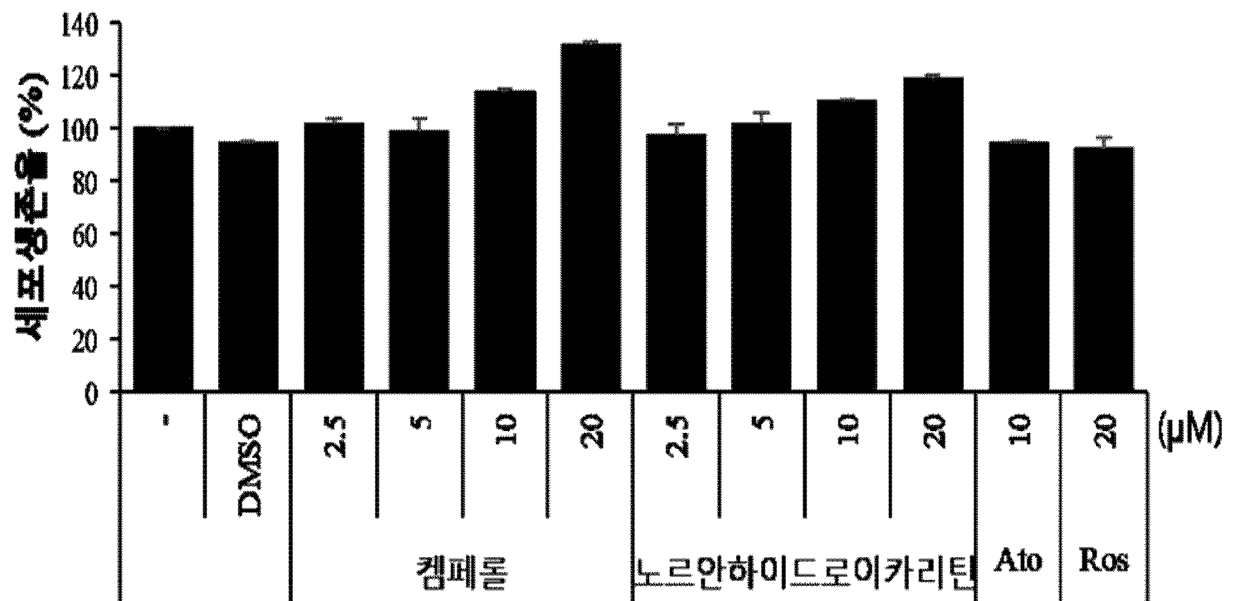
[화학식1]



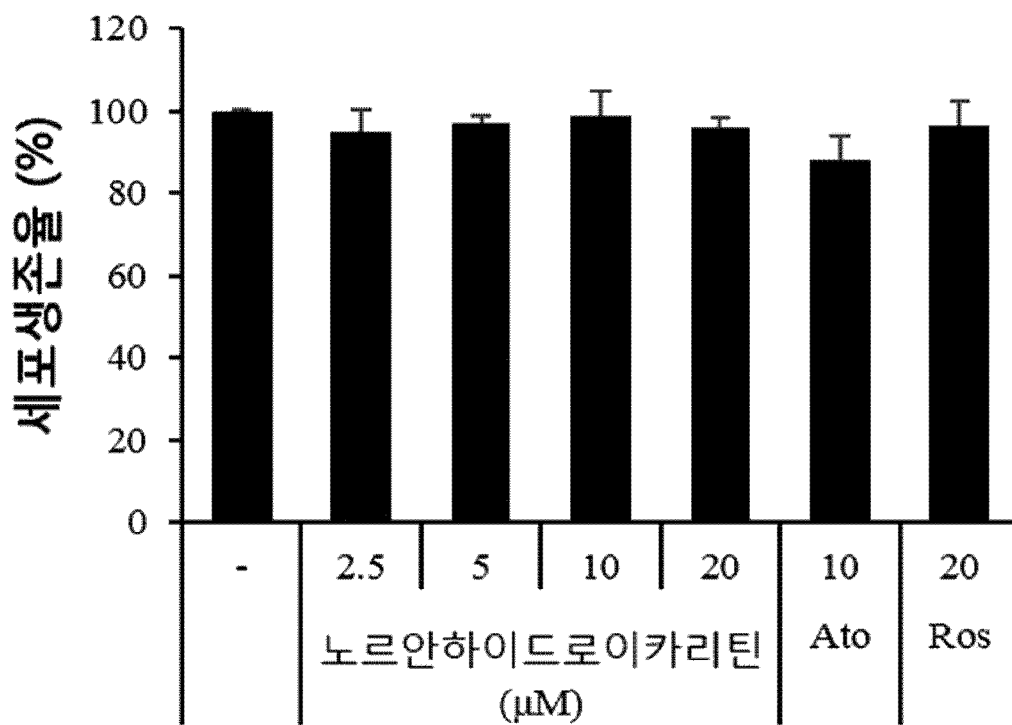
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 심혈관 대사 질환은 심혈관 질환 또는 지질 대사 이상에 의한 대사성 질환인, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 심혈관 질환은 고혈압, 협심증, 심근경색, 뇌경색, 뇌졸중, 및 부정맥으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 지질 대사 이상에 의한 대사성 질환은 이상지질혈증, 고지혈증, 관상동맥경화증, 죽상동맥경화증 및 비만으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 스타틴 계열 약물을 추가로 포함하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 스타틴 계열 약물은 HMG-CoA 환원효소의 저해 활성을 갖는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 스타틴 계열 약물은 아토르바스타틴(Atorvastatin), 로수바스타틴(Rosuvastatin), 피타바스타틴(Pitavastatin), 프라바스타틴(Pravastatin), 심바스타틴(Simvastatin), 또는 플루바스타틴(Fluvastatin)인, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 10] 제1 내지 제7항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 11] 노르안하이드로이카리틴 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 스타틴 계열 약물의 부작용 완화용 보조제.

- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 스타틴 계열 약물은 아토르바스타틴, 로수바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴, 또는 플루바스타틴인, 보조제.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 부작용은 스타틴 계열 약물 처리에 따른 PCSK9의 동반 증가인 것인, 보조제.
- [청구항 14] 노르하이드로이카리틴 및 스타틴 계열 약물을 병용 투여하는 단계를 포함하는, 스타틴 계열 약물의 부작용을 완화시키는 방법.

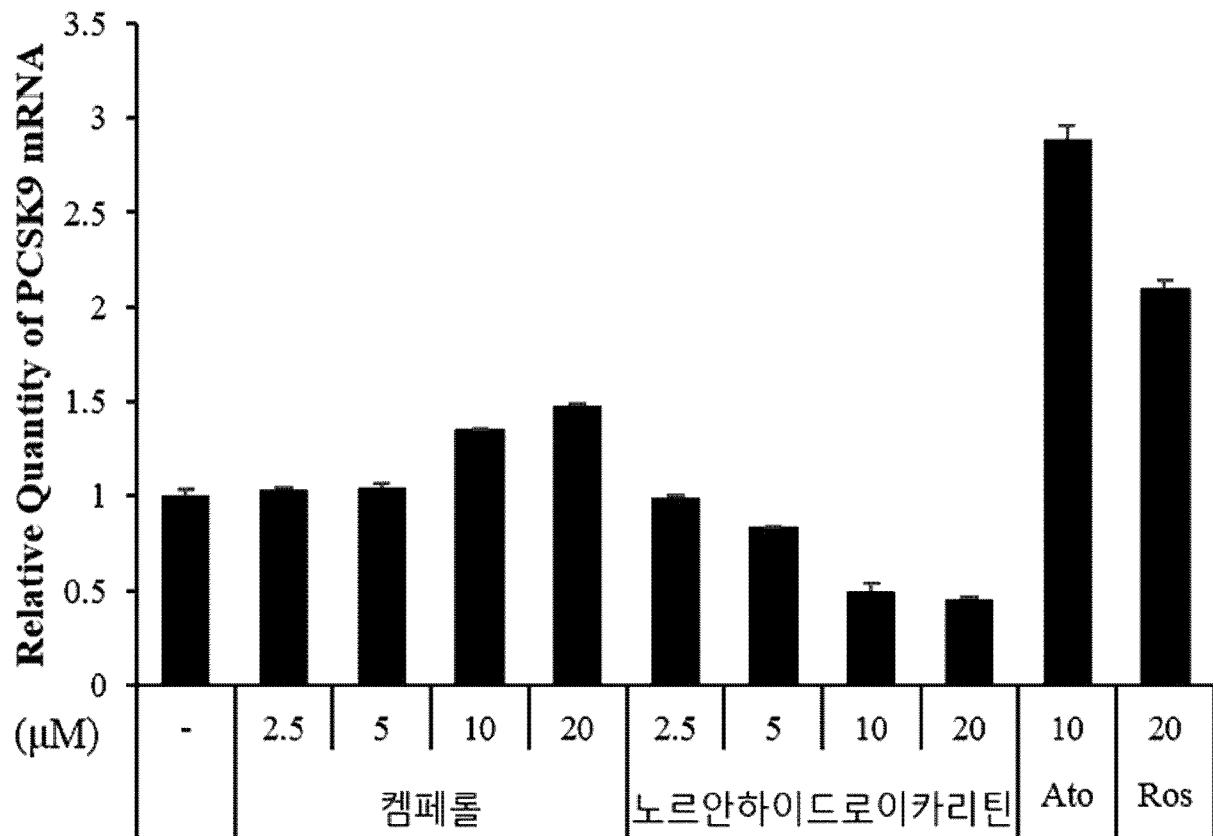
[도1]



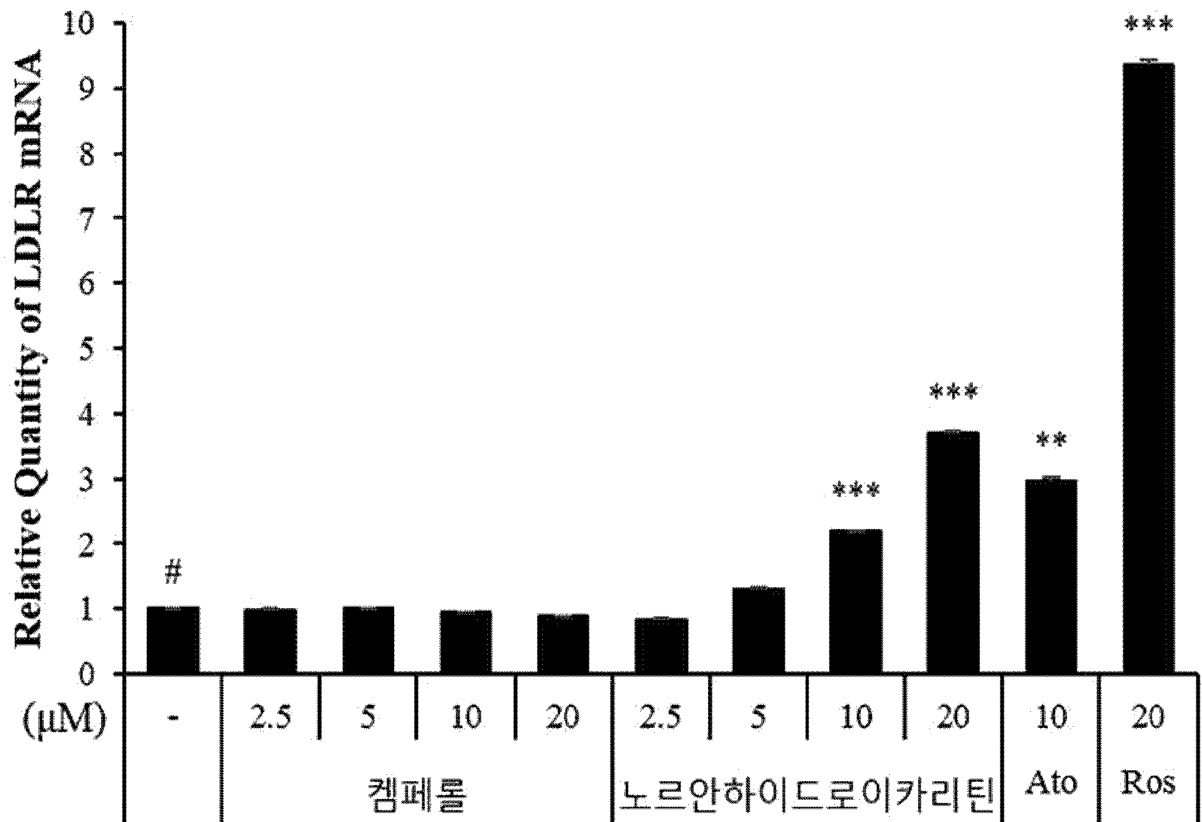
[도2]



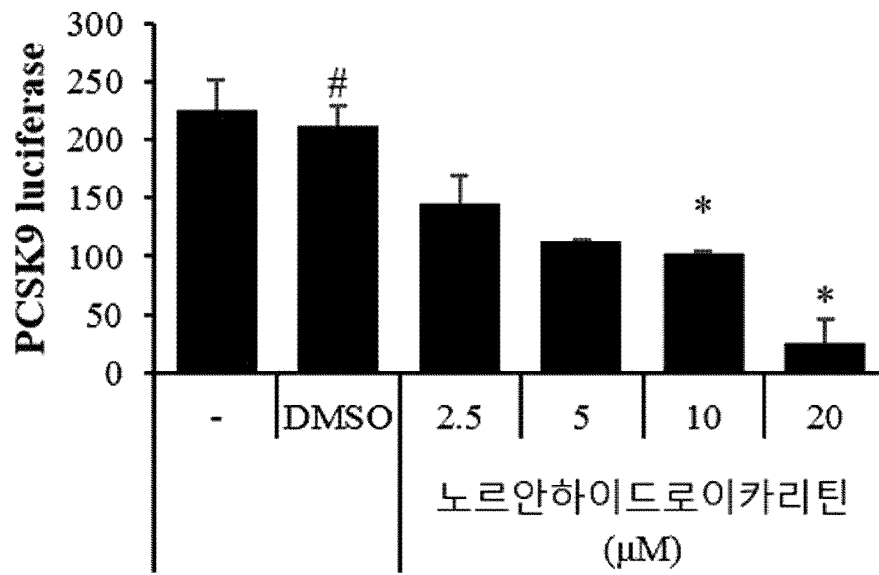
[도3]



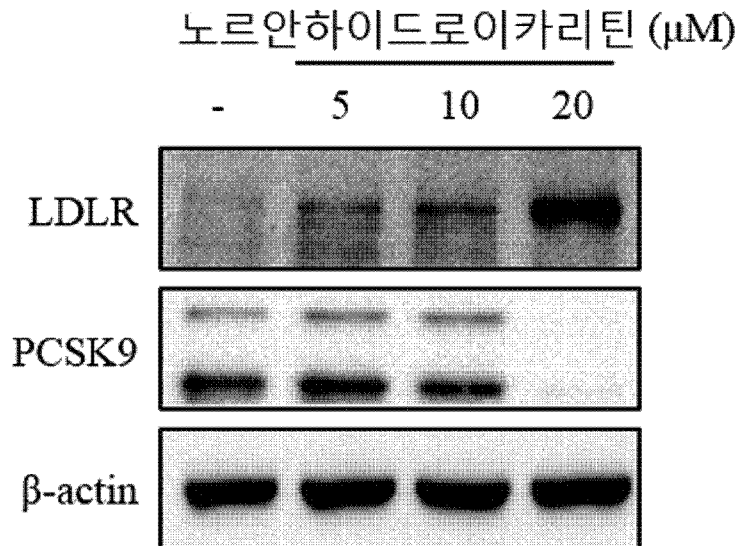
[도4]



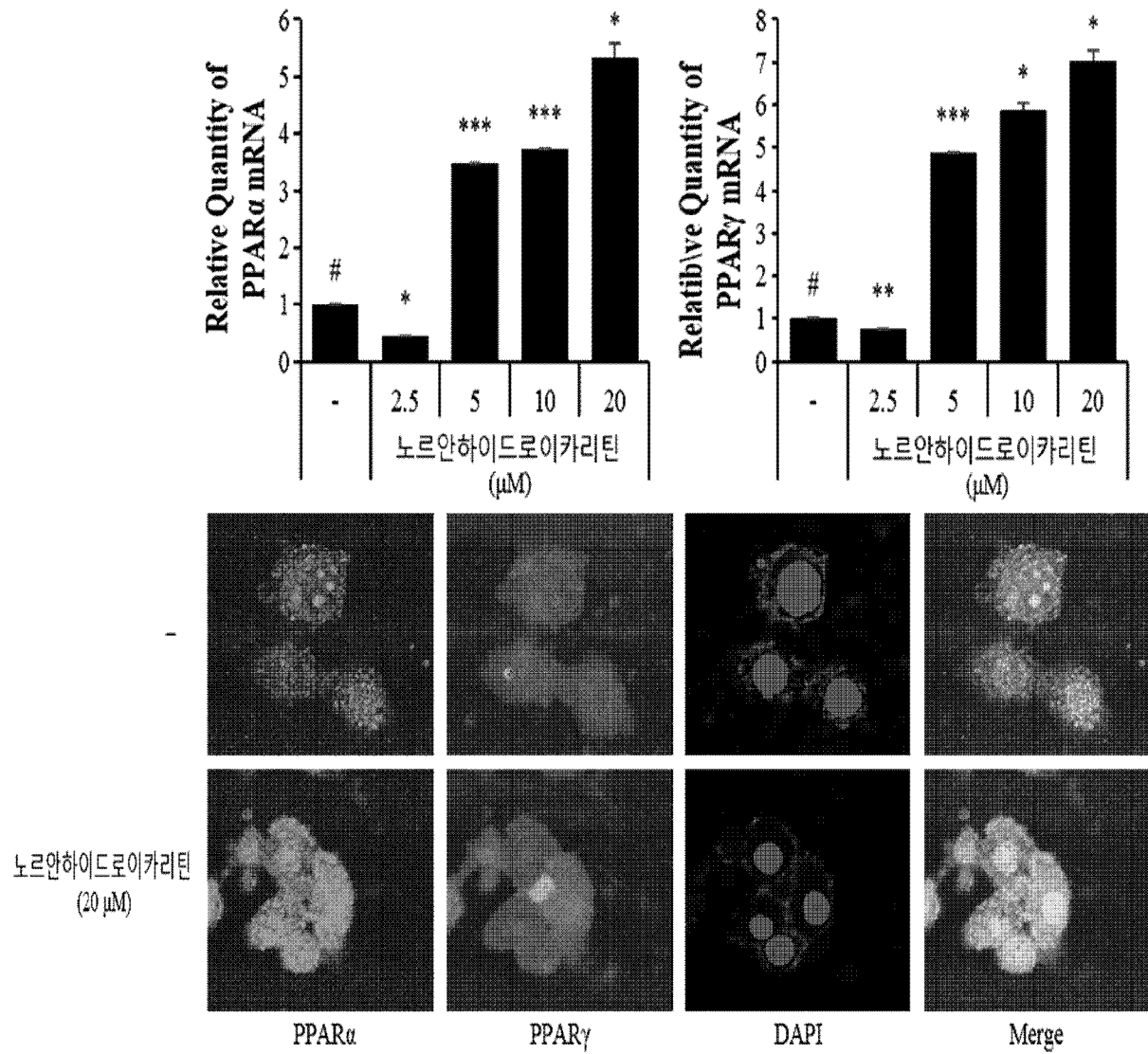
[도5]



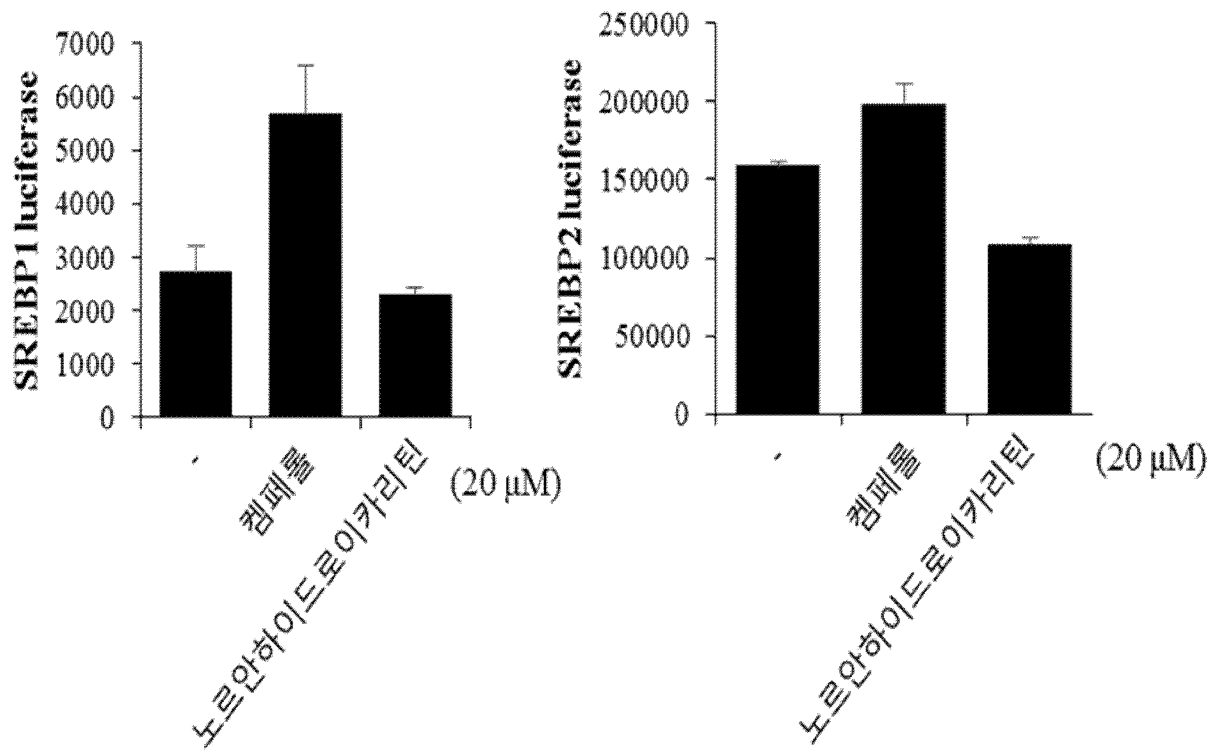
[도6]



[도7]

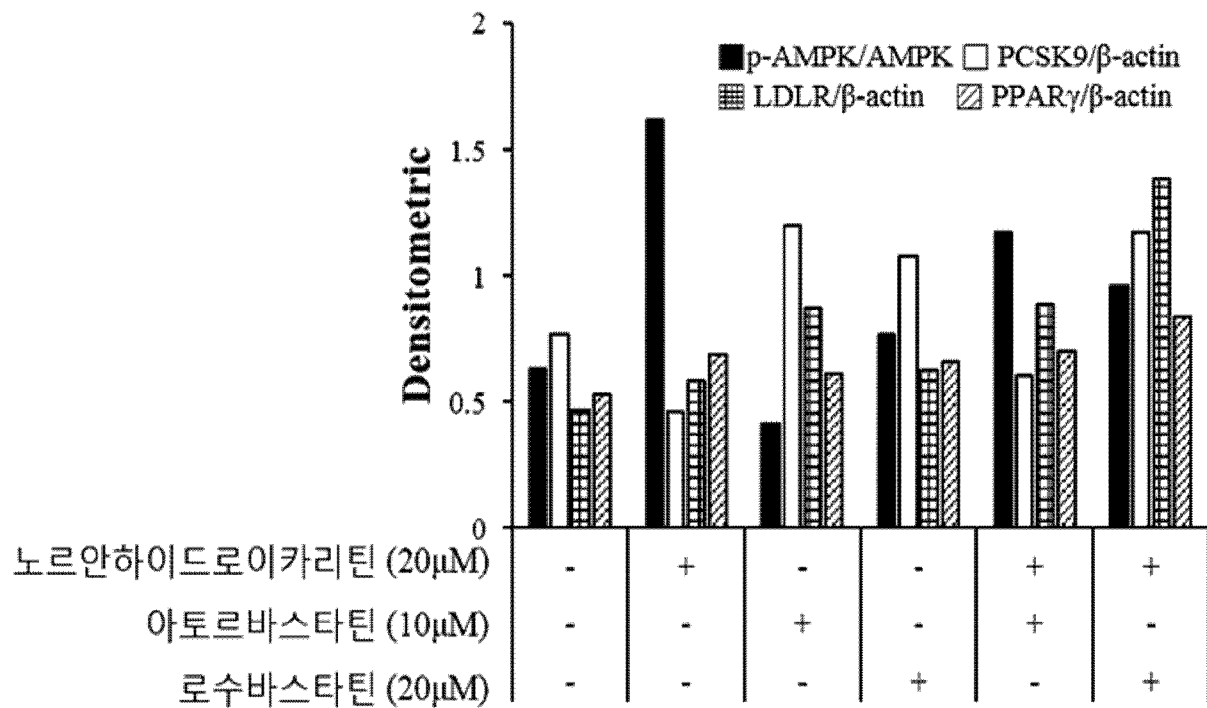
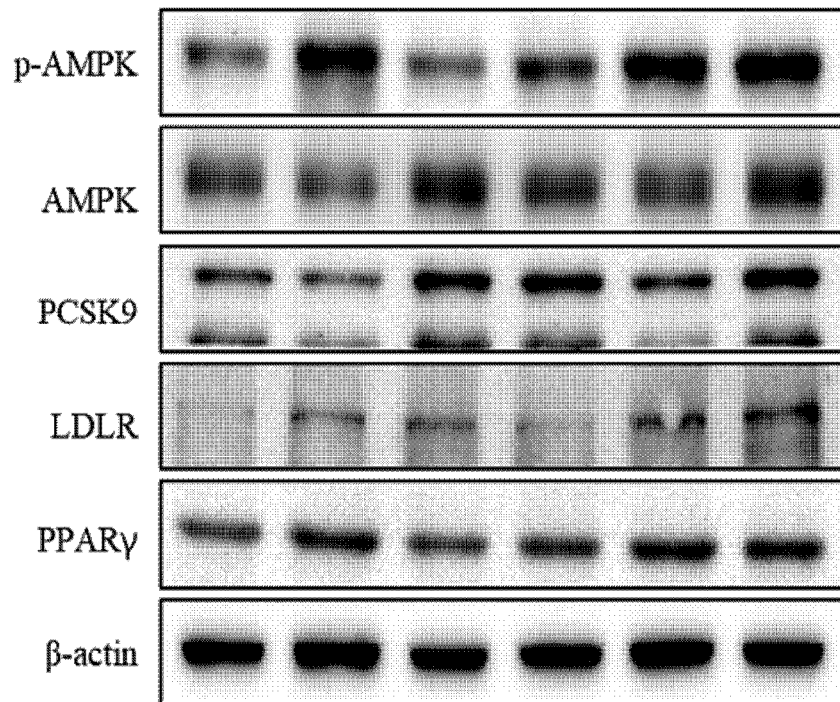


[도8]



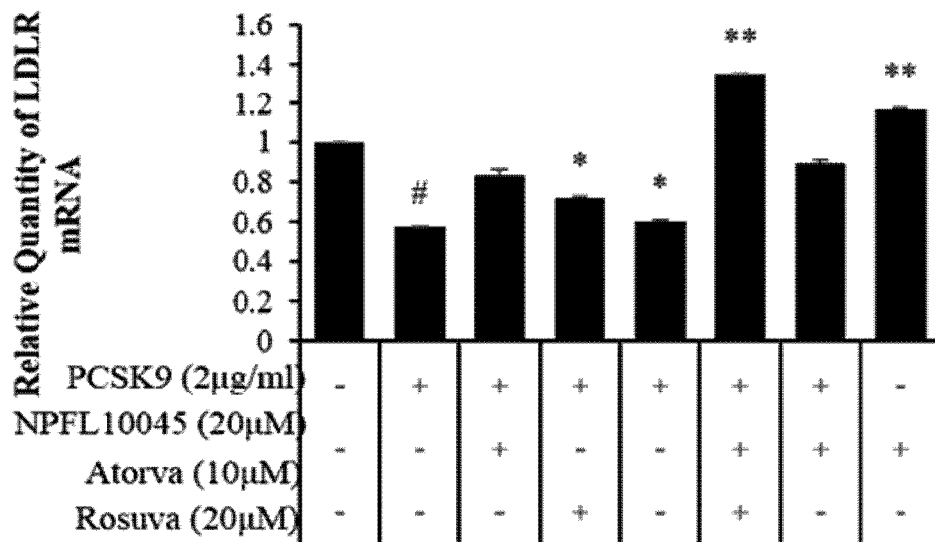
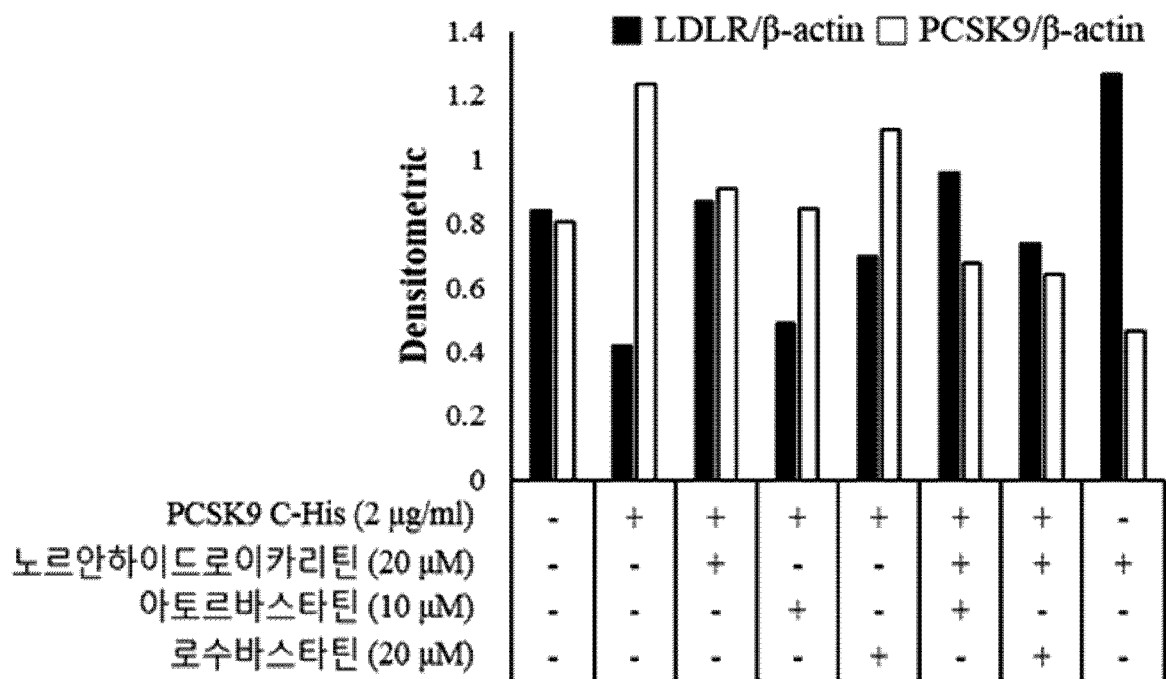
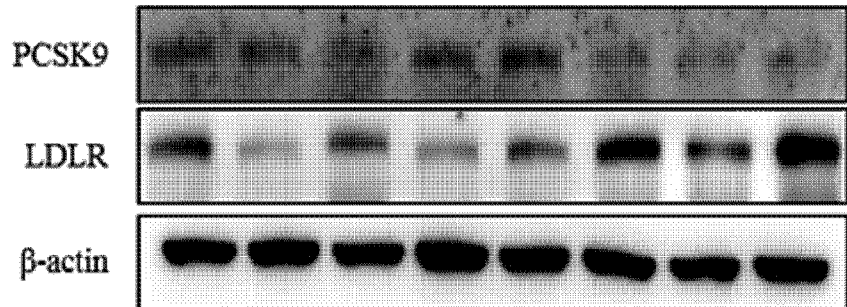
[도9]

노르안하이드로이카리틴 (20 μ M)	-	+	-	-	+	+
아토르바스타틴 (10 μ M)	-	-	+	-	+	-
로수바스타틴 (20 μ M)	-	-	-	+	-	+

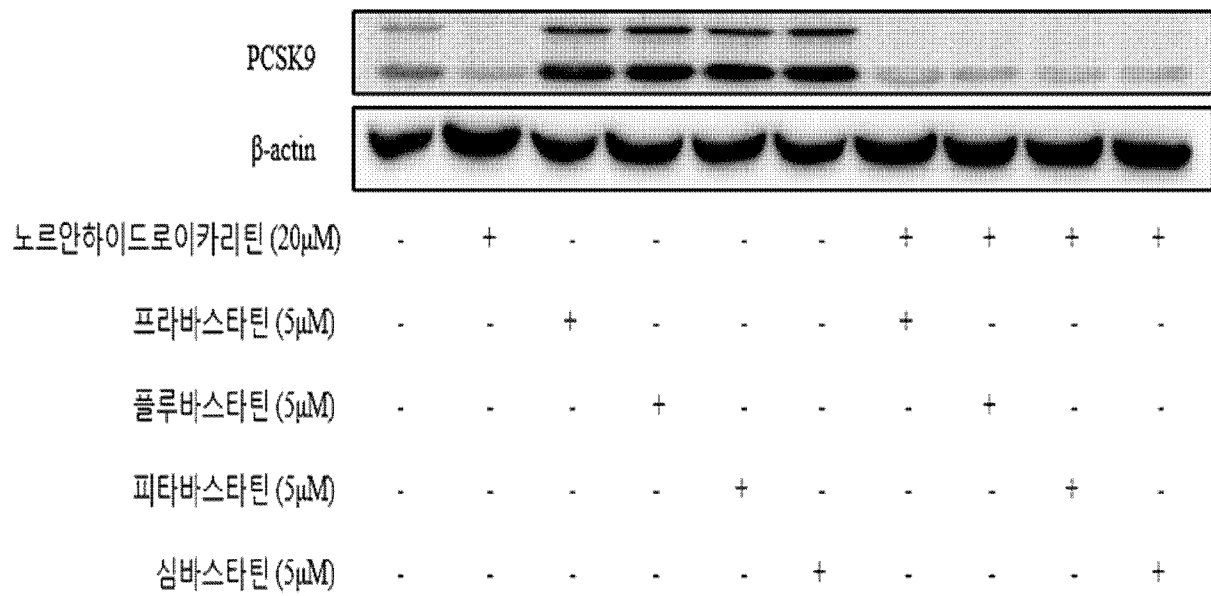


[도10]

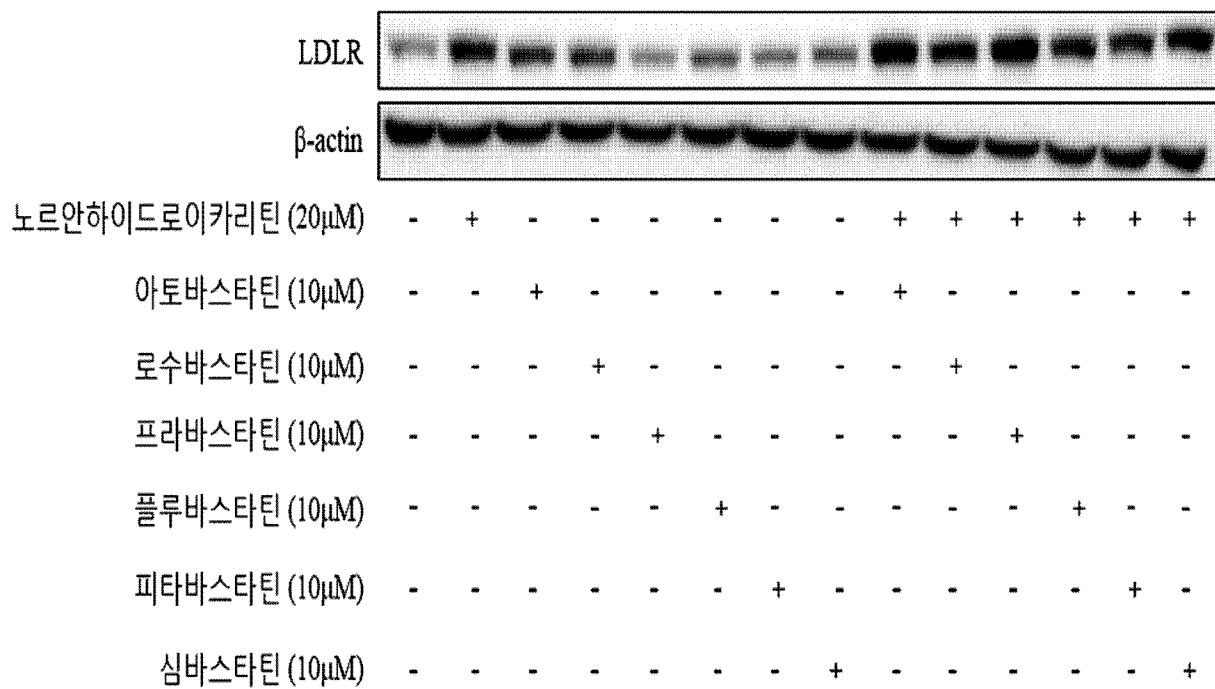
노르안하이드로이카리틴 (20 μ M)	-	-	+	-	-	+	+	+
아토르바스타틴 (10 μ M)	-	-	-	+	-	+	-	-
로수바스타틴 (20 μ M)	-	-	-	-	+	-	+	-
PCSK9 C-His (2 μ g/ml)	-	+	+	+	+	+	+	-



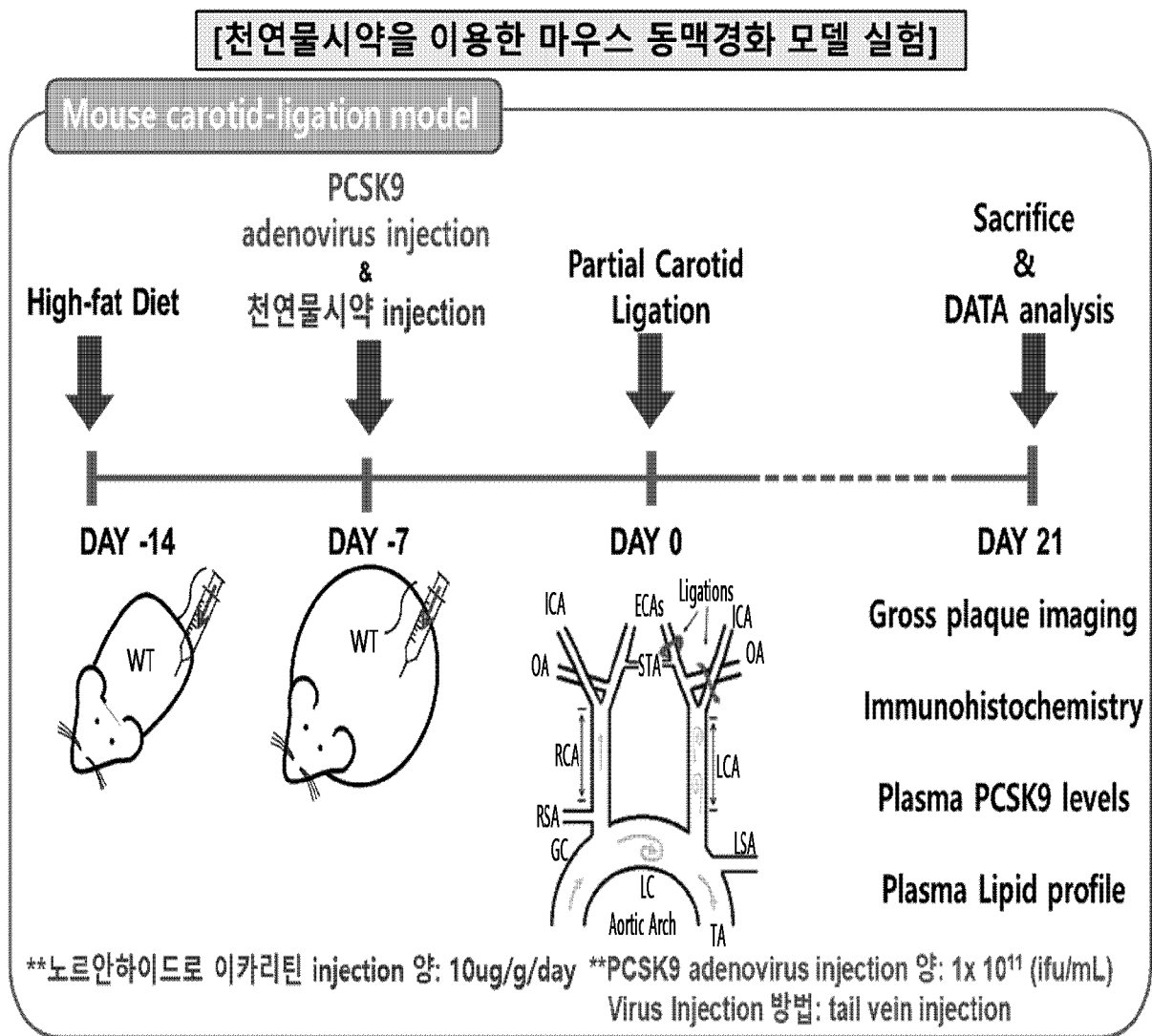
[도 11]



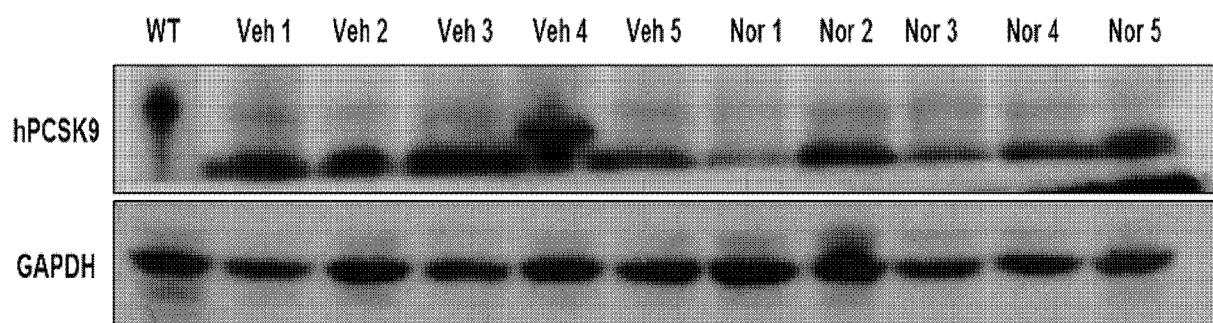
[도 12]



[도 13]



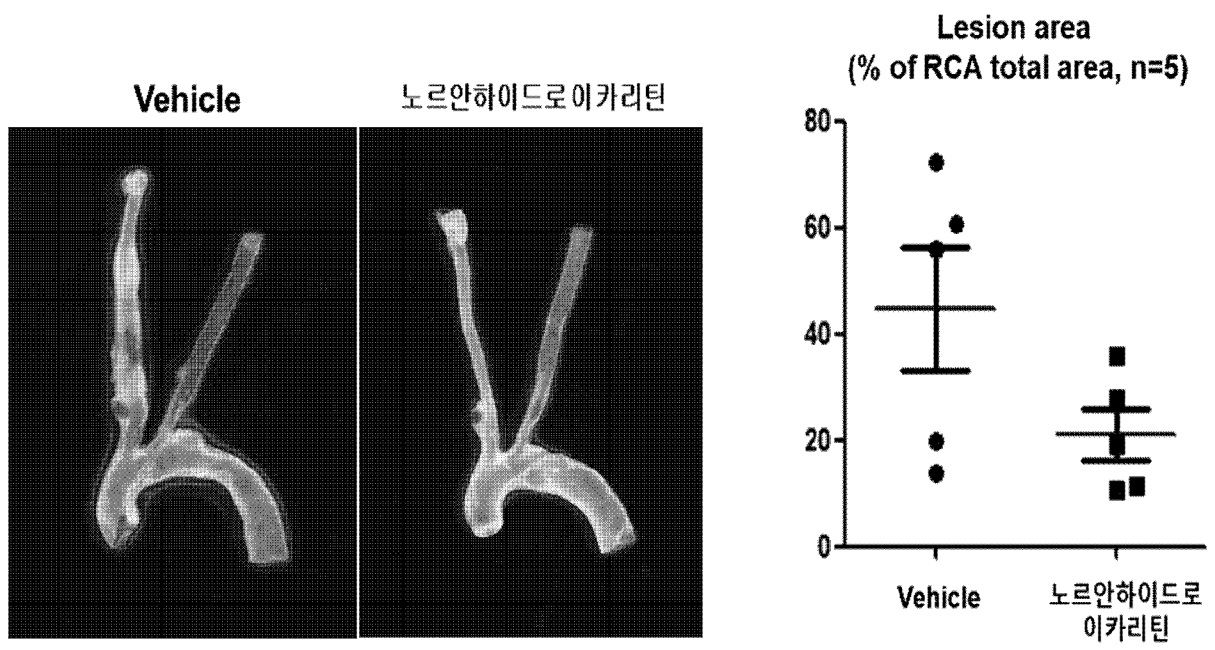
[514]



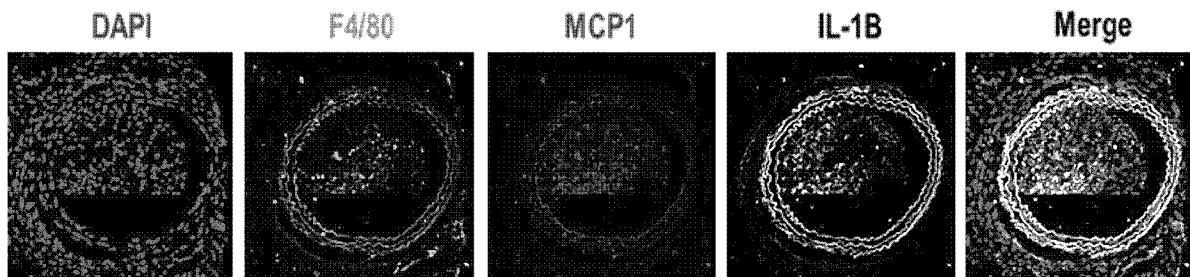
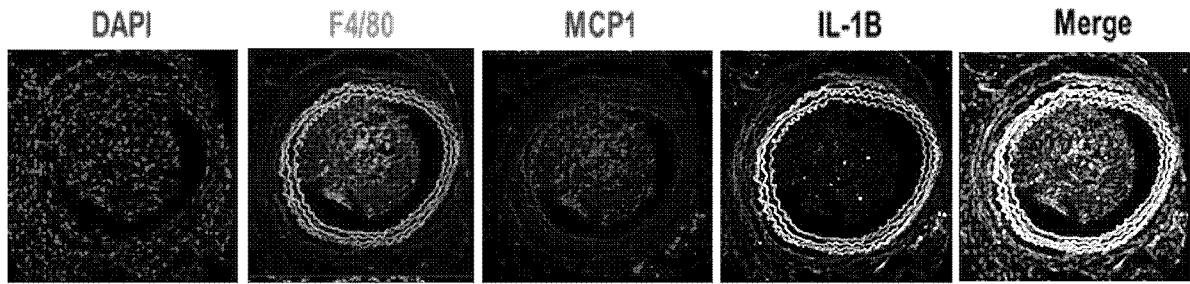
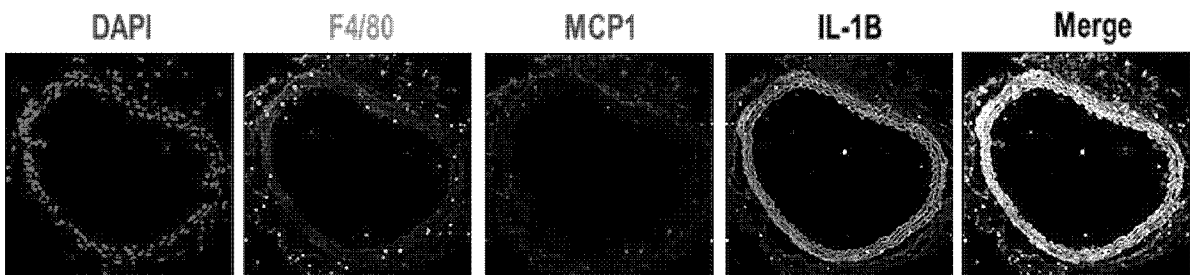
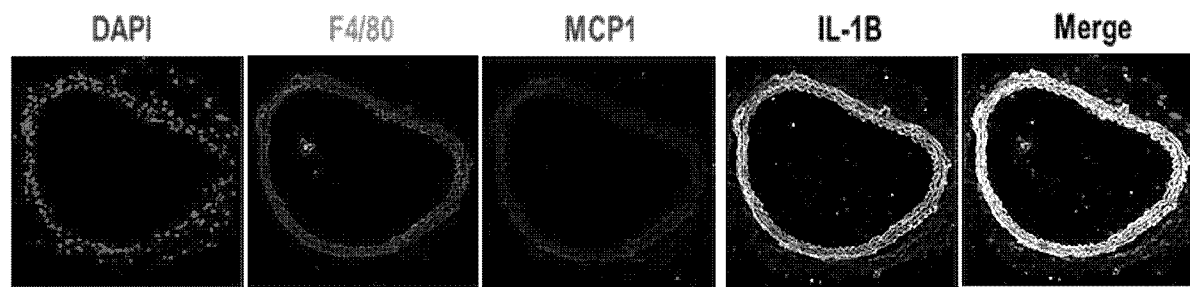
hPCKSK9

GAPDH

[도15]



[도16]

Vehicle**노르안하이드로 이카리틴**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/002773

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/40(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i, A61P 3/06(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)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 31/352; A61K 31/12; A61K 31/22; A61K 31/35; A61K 31/40; A61K 31/404; A61K 35/34; A61K 36/48; A61K 38/10; A61K 45/06; A61P 9/00; A61P 3/06; A61P 3/04; A23L 33/10

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: noranhydroicaritin, statin, arteriosclerosis, hypertension, PCSK9, LDLR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2009-0084439 A (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 05 August 2009 See claims 1, 6; experimental examples 2-4.	1-4,8,9
Y		5-7,11-13
Y	MIHAYLOVA, B. et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. Lancet. 2012, no. 38, pages 581-590 See abstract; discussion; table 1.	5-7,11-13
A	KR 10-2016-0083806 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 12 July 2016 See claims 1, 6, 8, 10-12; paragraphs [0003]-[0005], [0085], [0091].	1-9,11-13
A	US 2015-0335685 A1 (EMORY UNIVERSITY) 26 November 2015 See claims 1, 5; paragraphs [0016]-[0020].	1-9,11-13
A	KR 10-2008-0090710 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 09 October 2008 See the entire document.	1-9,11-13
A	KR 10-2018-0041233 A (LES LABORATOIRES SERVIER) 23 April 2018 See the entire document.	1-9,11-13



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

04 JUNE 2020 (04.06.2020)

Date of mailing of the international search report

04 JUNE 2020 (04.06.2020)

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

International application No.

PCT/KR2020/002773

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.: **10, 14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10 and 14 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy (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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/002773

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0084439 A	05/08/2009	None	
KR 10-2016-0083806 A	12/07/2016	WO 2016-108572 A2 WO 2016-108572 A3	07/07/2016 15/12/2016
US 2015-0335685 A1	26/11/2015	US 2019-151369 A1	23/05/2019
KR 10-2008-0090710 A	09/10/2008	KR 10-0867370 B1	06/11/2008
KR 10-2018-0041233 A	23/04/2018	BR 112018003392 A2 CN 108135882 A EA 201890591 A1 EP 3340980 A1 FR 3040303 A1 FR 3040303 B1 MX 2018002373 A PH 12018500370 A1 RU 2018110622 A RU 2018110622 A3 SG 11201801382 A WO 2017-032953 A1	25/09/2018 08/06/2018 28/09/2018 04/07/2018 03/03/2017 05/04/2019 06/07/2018 29/08/2018 27/09/2019 31/01/2020 28/03/2018 02/03/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/40(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i, A61P 3/06(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/352; A61K 31/12; A61K 31/22; A61K 31/35; A61K 31/40; A61K 31/404; A61K 35/34; A61K 36/48; A61K 38/10; A61K 45/06; A61P 9/00; A61P 3/06; A61P 3/04; A23L 33/10

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: 노르안하이드로이카리틴(noranhidroicaritin), 스타틴(statin), 동맥경화증(arteriosclerosis), 고혈압(hypertension), PCSK9, LDLR

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2009-0084439 A (부경대학교 산학협력단) 2009.08.05 청구항 1, 6; 실험예 2-4	1-4, 8, 9
Y		5-7, 11-13
Y	MIHAYLOVA, B., 등, "The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials", Lancet, 2012, 제380호, 페이지 581-590 초록; discussion; 표 1	5-7, 11-13
A	KR 10-2016-0083806 A (연세대학교 산학협력단) 2016.07.12 청구항 1, 6, 8, 10-12; 단락 [0003]-[0005], [0085], [0091]	1-9, 11-13
A	US 2015-0335685 A1 (EMORY UNIVERSITY) 2015.11.26 청구항 1, 5; 단락 [0016]-[0020]	1-9, 11-13
A	KR 10-2008-0090710 A (한국과학기술연구원) 2008.10.09 전문	1-9, 11-13
A	KR 10-2018-0041233 A (르 라보레토레 셰르비에르) 2018.04.23 전문	1-9, 11-13

☐ 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 04일 (04.06.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 06월 04일 (04.06.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



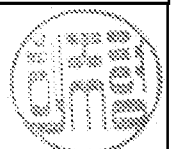
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



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: 10, 14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10, 14는 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 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.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0084439 A	2009/08/05	없음	
KR 10-2016-0083806 A	2016/07/12	WO 2016-108572 A2 WO 2016-108572 A3	2016/07/07 2016/12/15
US 2015-0335685 A1	2015/11/26	US 2019-151369 A1	2019/05/23
KR 10-2008-0090710 A	2008/10/09	KR 10-0867370 B1	2008/11/06
KR 10-2018-0041233 A	2018/04/23	BR 112018003392 A2 CN 108135882 A EA 201890591 A1 EP 3340980 A1 FR 3040303 A1 FR 3040303 B1 MX 2018002373 A PH 12018500370 A1 RU 2018110622 A RU 2018110622 A3 SG 11201801382 A WO 2017-032953 A1	2018/09/25 2018/06/08 2018/09/28 2018/07/04 2017/03/03 2019/04/05 2018/07/06 2018/08/29 2019/09/27 2020/01/31 2018/03/28 2017/03/02